PCT/JP2004/015220

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

18.10.2004

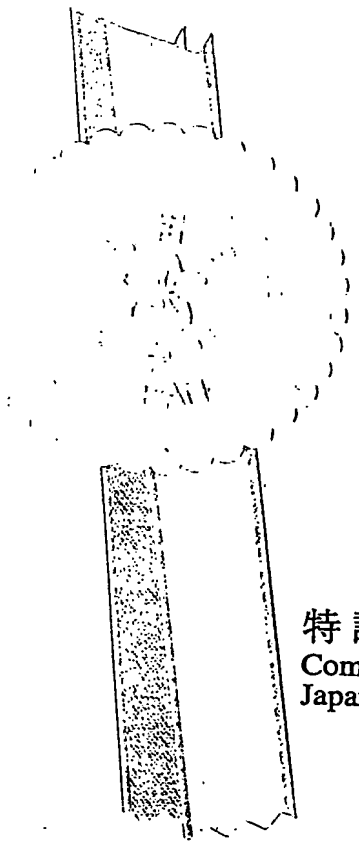
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: ２００３年１０月１５日

出願番号
Application Number: 特願２００３－３５４９８３
[ST. 10/C]: [ＪＰ２００３－３５４９８３]

出願人
Applicant(s): 財団法人新産業創造研究機構

REC'D 09 DEC 2004
WIPO PCT



PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

２００４年１１月２５日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川洋

出証番号　出証特２００４－３１０６７１４

【書類名】　特許願
【整理番号】　0112-JP01
【提出日】　平成15年10月15日
【あて先】　特許庁長官　殿
【国際特許分類】　C12N 15/09
C12N 15/861
【発明者】
【住所又は居所】　兵庫県神戸市東灘区御影町御影城の前１４３０　ヒースコート御影城の前
【氏名】　後藤　章暢
【発明者】
【住所又は居所】　愛媛県松山市西石井１－１－８　西石井ハイツ４０６
【氏名】　濱田　雄行
【発明者】
【住所又は居所】　兵庫県神戸市灘区篠原北町２丁目８－５
【氏名】　白川　利朗
【特許出願人】
【識別番号】　800000057
【氏名又は名称】　財団法人新産業創造研究機構
【代理人】
【識別番号】　100115026
【弁理士】
【氏名又は名称】　圓谷　徹
【電話番号】　06-6456-0588
【手数料の表示】
【予納台帳番号】　201788
【納付金額】　21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】　特許請求の範囲　1
【物件名】　明細書　1
【物件名】　図面　1
【物件名】　要約書　1
【包括委任状番号】　0308050

【書類名】特許請求の範囲
【請求項１】
オンコリティックウイルスを感染させ、同ウイルスを腫瘍細胞に作用させるためのキャリアー細胞を含み、当該キャリアー細胞は以下の（１）～（４）の細胞から選ばれる、癌遺伝子治療薬。
（１）Ａ５４９細胞
（２）２９３細胞
（３）ＳＷ６２６細胞
（４）ＨＴ―ＩＩＩ細胞
【請求項２】
上記キャリアー細胞に感染させるオンコリティックウイルスは、治療対象の癌の種類等に応じて、ＩＡＩ．３Ｂプロモーター、ミッドカインプロモーター、β―ＨＣＧプロモーター、ＳＣＣＡ１プロモーター、ｃｏｘ－２プロモーター、ＰＳＡプロモーター、又はその他の腫瘍特異的プロモーターを有する、請求項１記載の癌遺伝子治療薬。
【請求項３】
上記オンコリティックウイルスは、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ＨＩＶウイルス等のレンチウイルス、レトロウイルス、レオウイルス、又はその他のオンコリティックウイルスから選ばれる、請求項１又は２記載の癌遺伝子治療薬。
【請求項４】
キャリアー細胞投与に対する生体のＣＴＬ反応を誘導するために投与される免疫処置用ウイルスと、オンコリティックウイルスを感染させ、同ウイルスを生体の腫瘍細胞に作用させるためのキャリアー細胞とを組み合わせた癌遺伝子治療薬。
【請求項５】
免疫処置用ウイルスおよびオンコリティックウイルスは、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ＨＩＶウイルス等のレンチウイルス、レトロウイルス、レオウイルス、又はその他のオンコリティックウイルスから選ばれる、請求項４記載の癌遺伝子治療薬。
【請求項６】
免疫処置用ウイルスは非増殖型のものおよび／又は不活化したものである、請求項４又は５記載の癌遺伝子治療薬。
【請求項７】
キャリアー細胞は、Ａ５４９細胞、２９３細胞、ＳＷ６２６細胞、ＨＴ―ＩＩＩ細胞、ＰＡ－１細胞、又はその他のヒト由来の癌細胞もしくは正常細胞から選ばれる、請求項４～６のいずれか１項に記載の癌遺伝子治療薬。
【請求項８】
キャリアー細胞に感染させるオンコリティックウイルスは、治療対象の癌の種類等に応じて、ＩＡＩ．３Ｂプロモーター、ミッドカインプロモーター、β―ＨＣＧプロモーター、ＳＣＣＡ１プロモーター、ｃｏｘ－２プロモーター、ＰＳＡプロモーター、又はその他の腫瘍特異的プロモーターを有する、請求項７記載の癌遺伝子治療薬。
【請求項９】
キャリアー細胞投与に対する生体のＣＴＬ反応を誘導するために免疫処置用ウイルスをヒトに投与し、所定期間経過後、オンコリティックウイルスを感染させ、同ウイルスを腫瘍細胞に作用させるためのキャリアー細胞を少なくとも１回ヒトに投与することを特徴とする癌遺伝子治療方法。
【請求項１０】
免疫処置用ウイルス投与からキャリアー細胞投与までの期間を、およそ２週間以上１３週間以下とする、請求項９記載の癌遺伝子治療方法。
【請求項１１】
免疫処置用ウイルスの投与量を、およそ10^{7}ウイルス粒子以上10^{11}ウイルス粒子以下とする、請求項９記載の癌遺伝子治療方法。
【請求項１２】

キャリアー細胞によるオンコリティックウイルスの１回の投与量を、およそ10^{11}ウイルス粒子以上10^{13}ウイルス粒子以下とする、請求項９記載の癌遺伝子治療方法。

【請求項１３】

キャリアー細胞に対するオンコリティックウイルスの感染量を、およそ５ウイルス粒子／細胞以上２０００ウイルス粒子／細胞以下とする、請求項９記載の癌遺伝子治療方法。

【請求項１４】

オンコリティックウイルスを用いた癌遺伝子治療方法において、鉄剤および／又はポルフィリン化合物を投与することを特徴とする癌遺伝子治療方法。

【請求項１５】

鉄剤および／又は５－アミノレブリン酸（5-aminolevulinic acid：ＡＬＡ）を投与する、請求項１４記載の癌遺伝子治療方法。

【書類名】明細書
【発明の名称】癌遺伝子治療薬
【技術分野】
【０００１】
本発明は、癌遺伝子治療薬、および同治療薬を用いた癌遺伝子治療方法に関するものである。
【背景技術】
【０００２】
近年、癌治療に関し、遺伝子治療が注目されており、これまでにも様々な遺伝子治療法が提案され、臨床試験が行われている。このうち、キャリアー細胞を使用した遺伝子治療については、Freemanらによって臨床試験が行われている。この遺伝子治療は、レトロウイルスによってＨＳＶ－ｔｋ遺伝子を導入した卵巣癌細胞ＰＡ－１をキャリアー細胞に使用するものであり、卵巣癌治療、さらに悪性中皮腫治療のための臨床試験が行われている（後述の非特許文献１・２参照）。一方、Culverらは、キャリアー細胞にマウスＮＩＨ－３Ｔ３細胞を使用して脳腫瘍に対する臨床試験を行っている（後述の非特許文献３参照）。しかし、ヒトへの癌治療の適用を考慮すると、キャリアー細胞にはヒト由来細胞を使用することが要請される。
【０００３】
卵巣癌細胞ＰＡ－１をキャリアー細胞に使用した遺伝子治療は、Coukosらによっても行われている（後述の非特許文献４参照）。この遺伝子治療は、腫瘍細胞において特異的に増殖するオンコリティックウイルス（oncolytic virus）を構築し、同ウイルスをキャリアー細胞（プロデューサー細胞）に感染させた後、このキャリアー細胞を腫瘍部位に投与するというものである。オンコリティックウイルスには単純ヘルペスウイルス１型（ＨＳＶ－１）が用いられ、ヌードマウスの卵巣癌腹腔内播種性転移モデルに対して腹腔内投与する動物実験が行われている（後述の特許文献１・２参照）。
【０００４】
しかし、上記の卵巣癌細胞ＰＡ－１は、増殖能力が高く操作しやすい細胞ではあるものの、細胞質が小さく壊れやすい。そのため、レトロウイルスによってＨＳＶ－ｔｋ遺伝子を導入しても腫瘍部位でのＨＳＶ－ｔｋ遺伝子発現は少なく、Freemanらの臨床試験では、卵巣癌および悪性中皮腫に対する充分な抗腫瘍効果は得られていない。
【０００５】
オンコリティックウイルスＨＳＶ－１による癌遺伝子治療においてキャリアー細胞としてＰＡ－１を使用した場合も、オンコリティックウイルスＨＳＶ－１の単独療法に比べて著明な抗腫瘍効果は得られていない。ウイルスによる癌遺伝子治療の問題点は、血中の中和抗体により頻回投与ができない点である。ＰＡ－１を使用した場合、細胞が脆弱でウイルス産生量も少ないため、細胞間相互作用（cell to cell interaction）により標的腫瘍細胞に感染する前に細胞が壊れてしまうこと、さらに、直接的に中和抗体によりウイルスが不活化され、抗腫瘍効果が得られないことなどが考えられる。
【０００６】
また、細胞性免疫遺伝子治療の臨床試験において、患者自身の癌細胞あるいは線維芽細胞（fibroblast）をキャリアー細胞に使用することがあるが、この場合安定した細胞系が得られるまで時間がかかり、手技が困難であること、さらに遺伝子導入が個体により差があり一定でないことから安定した効果を得ることが困難であった。
【０００７】
【非特許文献１】Human Gene Therapy, 6, 927-939, 1995
【非特許文献２】Human Gene Therapy, 9, 2641-2649, 1998
【非特許文献３】Science, 256, 1550-1552, 1992
【非特許文献４】Clinical Cancer Research, 5, 1523-1537, 1999
【特許文献１】国際公開第９９／４５７８３号パンフレット
【特許文献２】国際公開第０１／２３００４号パンフレット

【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００８】
本発明は、このような従来の問題点を解決するため、特にオンコリティックウイルスを用いた癌遺伝子治療において、強力な抗腫瘍効果が得られる新たなキャリアー細胞を見出すことを第一の課題とする。
【０００９】
また、本発明の第二の課題は、さらに劇的な抗腫瘍効果が得られる新たな癌遺伝子治療法を確立すること、および、同治療法に用いる新たな癌遺伝子治療薬を提供することにある。
【課題を解決するための手段】
【００１０】
本発明者は、上記の課題に鑑み鋭意研究を進めた結果、（１）キャリアー細胞に特定の細胞株を使用することで、従来のキャリアー細胞に比べて強力な抗腫瘍効果が得られること、さらに、（２）予めウイルスを投与して免疫処置を施した後、オンコリティックウイルスを感染させたキャリアー細胞を投与することで、生体のＣＴＬ反応が誘導・惹起され、in vivoにおいて劇的な抗腫瘍効果が得られること、等を見出し、本発明を完成させるに至った。
【００１１】
即ち、本発明の第一の癌遺伝子治療薬は、オンコリティックウイルスを感染させ、同ウイルスを腫瘍細胞に作用させるためのキャリアー細胞を含み、当該キャリアー細胞は以下の（１）～（４）の細胞から選ばれるものである。
（１）Ａ５４９細胞
（２）２９３細胞
（３）ＳＷ６２６細胞
（４）ＨＴ―ＩＩＩ細胞
【００１２】
好ましくは、上記キャリアー細胞に感染させるオンコリティックウイルスは、治療対象の癌の種類等に応じて、ＩＡＩ．３Ｂプロモーター、ミッドカインプロモーター、β―ＨＣＧプロモーター、ＳＣＣＡ１プロモーター、ｃｏｘ－２プロモーター、ＰＳＡプロモーター、又はその他の腫瘍特異的プロモーターを有する。その他オンコリティックウイルスは、ＯＮＹＸ社のＥ１Ｂ遺伝子欠失型のオンコリティックアデノウイルス、あるいは、ＵＡＢ大学のＥ１Ａ遺伝子の一部欠損型のAd5-△24アデノウイルスなど、腫瘍特異的プロモーターを有しないものであってもよい。また好ましくは、上記オンコリティックウイルスは、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ＨＩＶウイルス等のレンチウイルス、レトロウイルス、レオウイルス、又はその他のオンコリティックウイルスから選ばれる。
【００１３】
本発明の第二の癌遺伝子治療薬は、キャリアー細胞投与に対する生体のＣＴＬ反応を誘導するために投与される免疫処置用ウイルスと、オンコリティックウイルスを感染させ、同ウイルスを生体の腫瘍細胞に作用させるためのキャリアー細胞とを組み合わせたものである。
【００１４】
本発明の第二の癌遺伝子治療薬において、好ましくは、（１）免疫処置用ウイルスおよびオンコリティックウイルスは、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ＨＩＶウイルス等のレンチウイルス、レトロウイルス、レオウイルス、又はその他のオンコリティックウイルスから選ばれる、（２）免疫処置用ウイルスは非増殖型のものおよび／又は紫外線等で不活化したものである、（３）キャリアー細胞は、Ａ５４９細胞、２９３細胞、ＳＷ６２６細胞、ＨＴ―ＩＩＩ細胞、ＰＡ－１細胞、又はその他のヒト由来の癌細胞もしくは正常細胞から選ばれる、（４）キャリアー細胞に感染させるオンコリティックウイルスは、治療対象の癌の種類等に応じて、ＩＡＩ．３Ｂプロモーター、ミッドカインプロモーター、

β—ＨＣＧプロモーター、ＳＣＣＡ１プロモーター、ｃｏｘ－２プロモーター、ＰＳＡプロモーター、又はその他の腫瘍特異的プロモーターを有する。

【００１５】

本発明の癌遺伝子治療方法は、キャリアー細胞投与に対する生体のＣＴＬ反応を誘導するために免疫処置用ウイルスをヒトに投与し、所定期間経過後、オンコリティックウイルスを感染させ、同ウイルスを腫瘍細胞に作用させるためのキャリアー細胞を少なくとも１回ヒトに投与することを特徴とする。

【００１６】

本発明の癌遺伝子治療方法において、好ましくは、免疫処置用ウイルス投与からキャリアー細胞投与までの期間を、およそ２週間以上１３週間以下とする。また好ましくは、（１）免疫処置用ウイルスの投与量を、およそ10^{7}ウイルス粒子以上10^{11}ウイルス粒子以下とし、（２）キャリアー細胞によるオンコリティックウイルスの１回の投与量を、およそ10^{11}ウイルス粒子以上10^{13}ウイルス粒子以下とし、（３）キャリアー細胞に対するオンコリティックウイルスの感染量を、およそ５ウイルス粒子／細胞（viral particle/cell：以下、「vp/cell」という。）以上２０００vp/cell以下とする。

【発明の効果】

【００１７】

本発明の第一の癌遺伝子治療薬は、選別の結果、in vitroおよびin vivoの双方において高い抗腫瘍効果が認められたＡ５４９細胞などの細胞株をキャリアー細胞として用いているので、従来のキャリアー細胞に比べて強力な抗腫瘍効果を得ることができる。

【００１８】

本発明の第二の癌遺伝子治療薬は、予め投与される免疫処置用ウイルスと、その後に投与されるキャリアー細胞との２種類の薬剤を組み合わせたものであり、予めアデノウイルス等のウイルス投与により免疫処置を施した後、オンコリティックウイルスを感染させたキャリアー細胞を投与することで、同ウイルスが標的腫瘍細胞に感染して直接的な抗腫瘍効果をもたらし、さらに感染標的細胞に対し生体のＣＴＬ反応が誘導され、in vivoにおいて劇的な抗腫瘍効果を得ることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１９】

以下、本発明の実施の一形態について説明する。

〔１〕本発明の第一の癌遺伝子治療薬

本発明の第一の癌遺伝子治療薬は、オンコリティックウイルスを感染させ、同ウイルスを腫瘍細胞に作用させるためのキャリアー細胞を含み、当該キャリアー細胞は以下の（１）～（４）の細胞から選ばれる。

（１）Ａ５４９細胞
（２）２９３細胞
（３）ＳＷ６２６細胞
（４）ＨＴ—ＩＩＩ細胞

【００２０】

図１は、癌遺伝子治療薬に用いる効果的なキャリアー細胞を見出すために本発明者がキャリアー細胞の選別を行った結果であり、より具体的には、各種候補細胞株にオンコリティックウイルスを感染させた癌遺伝子治療薬を調製し、各々の癌細胞増殖抑制効果を調査した結果を示すグラフである。オンコリティックウイルスには、アデノウイルスＡｄＥ３－ＩＡＩ．３Ｂを使用した。このアデノウイルスＡｄＥ３－ＩＡＩ．３Ｂは、Ｅ１Ａ遺伝子およびＥ３遺伝子を有し、かつ、Ｅ１Ａ遺伝子の上流に腫瘍特異的プロモーターとして卵巣癌特異的ＩＡＩ．３Ｂプロモーターを有するアデノウイルスである。このアデノウイルスＡｄＥ３－ＩＡＩ．３Ｂを各種候補細胞株に対して５００vp/cellで２日間感染させた後、各細胞を培養２日目の卵巣癌細胞ＨＥＹに添加し、培養５日目に同癌細胞ＨＥＹの増殖抑制効果を調べた。

【００２１】

図１のグラフ縦軸は、各種候補細胞株について５０％の増殖抑制効果（ＩＣ５０）が得られる細胞数を示し、細胞数が少ない細胞株ほど増殖抑制効果が高いことになる。同図に示すように、今回調査した癌細胞株では、２９３細胞、Ａ５４９細胞、ＳＷ６２６細胞、ＨＴ―ＩＩＩ細胞の順に高い増殖抑制効果を示した。２９３細胞、Ａ５４９細胞およびＳＷ６２６細胞は、従来キャリアー細胞として使用されていたＰＡ－１細胞に比べて、およそ１００倍程度の高い増殖抑制効果を示した。ＨＴ―ＩＩＩ細胞についても、ＳＷ６２６細胞と同程度の高い増殖抑制効果を示した。

【００２２】

また、上記の２９３細胞、Ａ５４９細胞、ＳＷ６２６細胞およびＨＴ―ＩＩＩ細胞にオンコリティックアデノウイルスを感染させた癌遺伝子治療薬を調製し、各治療薬について、充分量の抗アデノウイルス中和抗体存在下（Ａｂ（+））における、癌細胞増殖抑制効果を検討した。その結果、図４に示すように、抗体存在下であっても、上記４種の細胞をキャリアー細胞に用いた癌遺伝子治療薬はいずれも強い癌細胞増殖抑制効果を示した。従来、ウイルスによる癌遺伝子治療は、抗体産生により頻回投与ができないことが難点とされていたが、上記４種の細胞をキャリアー細胞に用いた場合は、抗体存在下にもかかわらずin vitroにおいて強力な増殖抑制効果が得られた。

【００２３】

さらに、ヌードマウス皮下腫瘍モデルを用いたin vivoの実験においても、上記のＡ５４９細胞、２９３細胞およびＳＷ６２６細胞をキャリアー細胞に用いた場合は、強力な抗腫瘍効果を示した（図５および図６参照）。なお、これら実験の詳細は後述の実施例において説明する。

【００２４】

このように、オンコリティックウイルスをキャリアー細胞に感染させて得られる癌遺伝子治療薬において、キャリアー細胞にＡ５４９細胞、２９３細胞、ＳＷ６２６細胞、ＨＴ―ＩＩＩ細胞のいずれかを使用することで高い抗腫瘍効果を得ることができる。

【００２５】

上記４種の細胞について説明すると、Ａ５４９細胞は、小細胞性肺癌細胞株であり、その詳細については例えば論文Giard,D.J., Aaronson,S.A., Todaro,G.J., Arnstein,P., Kersey,J.H., Dosik,H., and Parks,W.P. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors, J. Natl. Cancer Inst., 51: 1417-1423, 1973.などに記載されている。２９３細胞は、ヒト胎児腎由来細胞であり、アデノウイルス産生細胞として試験研究に多く用いられている細胞株である。２９３細胞については例えば論文Xie QW , et al. Complementation analysis of mutants of nitric oxide synthase reveals that the active site requires two hemes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 4891-4896, 1996.などに説明がある。ＳＷ６２６細胞は、大腸癌卵巣転移株であり、その詳細については例えば論文Fogh Ｊ , et al. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. J. Natl. Cancer Inst. 58: 209-214, 1977.などに記載されている。ＨＴ―ＩＩＩ細胞は、子宮頚部扁平上皮癌細胞であり、その詳細については例えば論文Fogh Ｊ , et al. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. J. Natl. Cancer Inst. 58: 209-214, 1977.などに記載されている。これら４種の細胞株はいずれもＡＴＣＣ（American Type Culture Collection）等の細胞保存機関から入手可能であり、その他、市販されているものを使用してもよい。

【００２６】

本発明の癌遺伝子治療薬において、上記キャリアー細胞に感染させるオンコリティックウイルスとしては、従来遺伝子導入に用いられるウイルスベクターを使用することができ、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス１型（ＨＳＶ－１）、単純ヘルペスウイルス２型（ＨＳＶ－２）、ＨＩＶウイルス（エイズウイルス）等のレンチウイルスやマウス白血病ウイルス等のレトロウイルス、レオウイルスなどが例示され、さらにその他のオンコリティックウイルスであってもよい。オンコリティックウイルスは、

増殖型ウイルスベクターであって標的の腫瘍細胞または腫瘍組織において特異的に増殖するようウイルス遺伝子を改変し、標的細胞を融解・殺傷するcell lysis作用を有するものであればよく、例えばアデノウイルスの場合、その増殖に必要なＥ１ＡまたはＥ１Ｂ領域を有するものであればよい。

【００２７】

本発明の癌遺伝子治療薬は、ほぼ全ての悪性腫瘍に適用することができ、治療対象となる癌の種類は、卵巣癌、扁平上皮癌（子宮頚部癌、皮膚癌、頭頚部癌、食道癌、肺癌等）、消化器癌（大腸癌、膵癌、肝癌、胃癌等）、神経芽細胞腫、脳腫瘍、乳癌、精巣癌、前立腺癌などが例示される。また、アデノウイルス34,35型など血液細胞にも感染可能なウイルスを使用することで、本発明の癌遺伝子治療薬は血液性悪性腫瘍にも適用可能である。

【００２８】

治療対象となる癌の種類に応じて、オンコリティックウイルスに導入する腫瘍特異的プロモーターの種類を選択するとよい。例えば、卵巣癌に対してはＩＡＩ．３Ｂプロモーター、脳腫瘍、悪性グリオーマなどに対してはミッドカインプロモーター、精巣癌に対してはβ—ＨＣＧプロモーター、扁平上皮癌に対してはＳＣＣＡ１プロモーターおよびＳＣＣＡ２プロモーター、大腸癌に対してはＣＥＡプロモーター、前立腺癌に対してはＰＳＡプロモーター、肝癌に対してはＡＦＰプロモーター、を使用することができる。勿論、他の公知の腫瘍特異的プロモーター、例えば、種々の悪性腫瘍に対してプロモーター活性を発揮し、広い作用スペクトラムを有するｃｏｘ－２プロモーターや、その他オステオカルシンプロモーター等の各種癌特異性プロモーターを使用してもよい。上記ミッドカインプロモーターについては、脳腫瘍、悪性グリオーマのほか種々の悪性腫瘍に対して使用可能であり、この点においてｃｏｘ－２プロモーターと同様に広い作用スペクトラムを有する。

【００２９】

使用する各プロモーター配列の長さ等については、腫瘍特異的プロモーター活性が得られる限りにおいて特に限定されるものではない。上記ＩＡＩ．３Ｂプロモーターは、国際公開第０３／０２５１９０号パンフレットおよび文献Cancer Research 63, 2506-2512, 2003の記載にしたがって設計・調製し、ウイルスゲノムに挿入することができる。上記のミッドカインプロモーター、β—ＨＣＧプロモーター、ＳＣＣＡ１プロモーターについては、それぞれ、国際公開第０２／１０３６８号パンフレット、国際公開第０１／９０３４４号パンフレット、国際公開第００／６００６８号パンフレットの記載にしたがって設計・調製し、ウイルスゲノムに挿入することができる。

【００３０】

上記ＳＣＣＡ１プロモーターについては、論文Biochimica et Biophysica Acta 91522 (2001) 1-8, Molecular cloning of human squamous cell carcinoma antigen 1 gene and characterization of its promoter, Katsuyuki Hamada, Hiroto Shinomiya, Yoshihiro Asano, Toshimasa Kihana, Mari Iwamoto, Yasushi Hanakawa, Koji Hashimoto, Susumu Hirose, Satoru Kyo, Masaharu Itoにも詳細な説明がなされている。

【００３１】

例えば、オンコリティックアデノウイルスを作製する場合、アデノウイルスの増殖に必須の遺伝子である初期遺伝子Ｅ１ＡまたはＥ１Ｂの上流に腫瘍特異的プロモーターを挿入するか、あるいは、初期遺伝子Ｅ１ＡまたはＥ１Ｂプロモーターと置換することにより構築することができる。ＨＳＶ－１、ＨＳＶ－２、レトロウイルス、レオウイルスなど、アデノウイルス以外のウイルスを使用する場合も、同様に、ウイルスの増殖に必要な遺伝子の上流に腫瘍特異的プロモーターを挿入するか、あるいは、当該遺伝子のプロモーターと置換することにより構築することができる。

【００３２】

もっとも、オンコリティックウイルスは、標的の腫瘍細胞または腫瘍組織において特異的に増殖する性質を有する限り、必ずしも腫瘍特異的プロモーターを有するものでなくてもよい。例えば、ＯＮＹＸ社のＥ１Ｂ遺伝子欠失型のオンコリティックアデノウイルス、

あるいは、ＵＡＢ大学のＥ１Ａ遺伝子の一部欠損型のAd5-△24アデノウイルスなど、腫瘍特異的プロモーターを有しないオンコリティックウイルスを使用することも可能である。

【００３３】

オンコリティックウイルスをキャリアー細胞に感染させる方法は、常法に従って行えばよく特に限定されるものではないが、例えばキャリアー細胞をデイッシュに播き、これにオンコリティックウイルスをすべての細胞に感染可能な量添加し、９５％O_2、５％CO_2、３７℃、牛胎児血清ＦＣＳ（－）、ＲＰＭＩ培地の条件下で６時間から３６時間程度培養し感染させる方法が簡便である。後述の実施例においては、Ａ５４９細胞、ＳＷ６２６細胞、ＨＴ―ＩＩＩ細胞はこの方法で培養し、オンコリティックウイルスを感染させたが、２９３細胞に関してはＦＣＳ（＋）１０％、ＤＭＥＭ培地の条件下で培養し、オンコリティックウイルスを感染させた。なお、牛胎児血清ＦＣＳは、６－１２時間感染の場合はＦＣＳ（－）の条件で、それ以上の時間感染させる場合は６－１２時間ＦＣＳ（－）の状態におき、後にＦＣＳ１０％を加えるとよい。

【００３４】

キャリアー細胞に対するオンコリティックウイルスの感染量および感染時間は、治療対象の腫瘍の大きさ・種類、キャリアー細胞の種類・投与量、使用するオンコリティックウイルスの種類、本遺伝子治療薬の投与方法などに応じて最適な量と時間を選択すればよい。特に限定されないが、一例として、キャリアー細胞にＡ５４９細胞を使用した場合、腹腔内投与では約５－２５０vp/cellでおよそ６－２４時間、腫瘍内投与では約５－５０vp/cellでおよそ１２－２４時間、ＳＷ６２６細胞の場合、腹腔内投与では約２５０－２００vp/cellでおよそ６－２４時間、腫瘍内投与では約１００－２５０vp/cellでおよそ１２－２４時間、２９３細胞の場合、腫瘍内投与では約５－５０vp/cellでおよそ６－２４時間、に設定することができる。このようにキャリアー細胞の種類、投与方法に応じて感染量・感染時間も異なるが、上記の例では腹腔内投与のときは約５－２０００vp/cellでおよそ６－２４時間、腫瘍内投与のときは約５－２５０vp/cellでおよそ１２－２４時間、の範囲でそれぞれ感染量・感染時間を設定することができる。

【００３５】

キャリアー細胞にオンコリティックウイルスを感染させ、本発明の癌遺伝子治療薬を調製する場合、使用時まではオンコリティックウイルスを感染させない状態でキャリアー細胞を保存しておくことが好ましい。キャリアー細胞の保存は、例えば液体窒素中あるいは－１５０℃程度の温度にて保存することができる。一方、オンコリティックウイルスは、例えば－８０℃程度の温度にて保存することができる。

【００３６】

使用時には、前記の方法によりオンコリティックウイルスをキャリアー細胞に感染させ、得られたウイルス感染キャリアー細胞を、これをそのまま、あるいは慣用の医薬製剤担体とともに本発明の癌遺伝子治療薬となし、ヒト（またはマウス、ラット等の実験動物）に投与することができる。なお、キャリアー細胞は、ウイルス感染前または感染後に放射線照射することが好ましい。後述の実施例では、キャリアー細胞にＡ５４９細胞、ＳＷ６２６細胞、ＨＴ－ＩＩＩ細胞を使用した場合、これらの細胞をヌードマウスに投与する前にそれぞれ６０－８０Ｇｙ、２０－４０Ｇｙ、２０－４０Ｇｙにて放射線照射を行った。

【００３７】

本発明の癌遺伝子治療薬は、非経口剤として投与することが好ましく、in vivo法、ex vivo法のいずれであってもよい。in vivo法の場合、腫瘍の大きさ・種類、症状の程度、患者の年齢、体重などに応じて用量（換言すれば、ウイルス感染キャリアー細胞の投与量）を調節し、例えば、静注、点滴静注、腫瘍内注射、腹腔注射のような腔内注射などによって投与する。このような注射剤は常法に従って製造され、希釈剤として一般に生理食塩水、細胞培養液等を用いることができる。さらに必要に応じて、殺菌剤、防腐剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤などを加えてもよい。これら製剤中のウイルス感染キャリアー細胞の配合量は特に限定されるものではなく任意に設定できる。

【００３８】

勿論、本発明の癌遺伝子治療薬は、数回にわたり患者に投与してもよいし、複数回のクールに分け、一クール当たりの投与回数、投与間隔などを任意に設定してもよい。

【００３９】

上記のように、ウイルス感染キャリアー細胞の投与量は、腫瘍の大きさ・種類、症状の程度、患者の年齢、体重などに応じて決定すればよいが、通常の場合、１回のキャリアー細胞の投与量をおよそ10^7細胞数以上10^9細胞数以下に、キャリアー細胞によるオンコリティックウイルスの１回の投与量をおよそ10^{11}ウイルス粒子以上10^{13}ウイルス粒子以下に設定することができる。

【００４０】

キャリアー細胞の種類も治療対象の癌の種類などに応じて適宜選択することができる。また、遺伝子組換え技術によってキャリアー細胞を改変し、例えば標的腫瘍細胞と結合しやすくなるようキャリアー細胞の細胞表面に人為的に特定タンパク質等を発現させてもよいし、キャリアー細胞にセンダイウイルスを感染させる等の処置を行ってもよい。

【００４１】

さらに、治療対象の癌におけるウイルス産生量を高めるために、鉄剤の投与および／又はポルフィリン化合物の投与を行ってもよい。ポルフィリン化合物としては、５－アミノレブリン酸（5-aminolevulinic acid：ＡＬＡ）、ヘマトポルフィリン（hematoporphyrin）、フォトフィリン（photofrin）等が例示される。鉄剤としては、経口剤として硫酸第一鉄（$FeSO_4$）、クエン酸第一鉄、静注用鉄剤としてコンドロイチン硫酸鉄、含糖酸化鉄が例示される。投与方法は特に限定されるものではないが、本発明の癌遺伝子治療薬とともに、注射剤あるいは経口剤として投与することが好ましい。

【００４２】

実際に、鉄剤（Ｆｅ）および／又は５－アミノレブリン酸（ＡＬＡ）を投与することにより、オンコリティックアデノウイルスAdE3-IAI.3Bの癌細胞増殖抑制効果を著しく亢進することができた（後述の実施例５参照）。

【００４３】

オンコリティックウイルスは、細胞間相互作用（cell to cell interatcion）によりキャリアー細胞から標的腫瘍細胞へと感染し、腫瘍細胞内で特異的に増殖し、腫瘍細胞を融解・殺傷するcell lysis作用を発揮することができる。ウイルスによる癌遺伝子治療は、抗体産生により頻回投与ができないことが難点とされていたが、キャリアー細胞を用いると細胞間相互作用により標的腫瘍細胞に直接的に感染が成立することによって頻回投与が可能となり、強力な抗腫瘍効果が期待できる。

【００４４】

〔２〕本発明の第二の癌遺伝子治療薬

本発明の第二の癌遺伝子治療薬は、キャリアー細胞投与に対する生体のＣＴＬ反応を誘導するために投与される免疫処置用ウイルスと、オンコリティックウイルスを感染させ、同ウイルスを生体の腫瘍細胞に作用させるためのキャリアー細胞とを組み合わせたもの、つまり、予め投与される免疫処置用ウイルスと、その後に投与されるキャリアー細胞との２種類の薬剤を組み合わせたものであり、予めアデノウイルス等のウイルス投与により免疫処置を施した後、オンコリティックウイルスを感染させたキャリアー細胞を投与することで、生体のＣＴＬ反応が誘導・惹起され、in vivoにおいて劇的な抗腫瘍効果を得ることができる。

【００４５】

実際に免疫機能が正常なsyngenicモデルマウスを使った実験において、本発明の癌遺伝子治療薬は劇的な抗腫瘍効果を示した。詳細は後述するが、（C57Black+C3H/He）Ｆ１マウスに卵巣癌細胞ＯＶＨＭを皮下移植し、その後、卵巣癌特異的プロモーターを導入したオンコリティックアデノウイルスを感染させたキャリアー細胞（Ａ５４９細胞）を局所注射したところ、３ヶ月前に予めアデノウイルスにより免疫処置を施こしたマウスでは、投与開始後３－４日で明らかな抗腫瘍効果を示し、９日後に腫瘍は完全に消失し、リンパ節転移も消失した（図７参照）。

【００４６】
このように、抗体産生があるにもかかわらずむしろ免疫力のあるマウスでより強力かつ劇的な抗腫瘍効果が得られたのは、免疫処置用アデノウイルスの投与によって生体のＣＴＬ反応（細胞障害性Ｔ細胞を介した細胞障害活性）が誘導・惹起されたためと考えられる。つまり、従来のウイルスによる癌遺伝子治療は、抗体産生により頻回投与ができないことが難点とされていたが、本発明の癌遺伝子治療薬は、生体の免疫機構を利用してウイルスが感染した標的腫瘍細胞を攻撃させることにより、むしろこれを武器に変えるものといえる。

【００４７】
免疫処置用ウイルスとオンコリティックウイルスとは同種類のものを使用することが好ましい。免疫処置用ウイルスには非増殖型のものおよび／又は不活化したものを使用することが好ましく、非増殖型のものを更に紫外線照射等によりＤＮＡを破壊し不活化したものがより好ましい。例えば、免疫処置用ウイルスにアデノウイルスを使用する場合は、Ｅ１領域が欠失したものおよび／又は紫外線照射によりＤＮＡを破壊し不活化したものを使用するとよい。

【００４８】
オンコリティックウイルスの種類、キャリアー細胞の種類、感染方法などは、前述した本発明の第一の癌遺伝子治療薬の場合と同様である。ただし、キャリアー細胞は、前記４種の細胞（即ち、Ａ５４９細胞、２９３細胞、ＳＷ６２６細胞、ＨＴ—ＩＩＩ細胞）を使用することが好ましいが、これに限定されるものではなく、他の細胞、例えば、ＰＡ－１細胞（特にヘルペスウイルスをオンコリティックウイルスに使用する場合等）、繊維芽細胞（fibroblast）、その他のヒト由来の癌細胞あるいは正常細胞、患者由来の癌細胞などをキャリアー細胞に使用してもよい。

【００４９】
オンコリティックウイルスのウイルス遺伝子に導入される腫瘍特異的プロモーターについても、癌の種類などに応じて前記プロモーター（即ち、ＩＡＩ．３Ｂプロモーター、ミッドカインプロモーター、β—ＨＣＧプロモーター、ＳＣＣＡ１プロモーター、ｃｏｘ－２プロモーター、ＰＳＡプロモーター、ＣＥＡプロモーターなど）を使用することが好ましいが、これに限定されるものではない。またオンコリティックウイルスは、ＯＮＹＸ社のＥ１Ｂ遺伝子欠失型のオンコリティックアデノウイルス、あるいは、ＵＡＢ大学のＥ１Ａ遺伝子の一部欠損型のAd5-△24アデノウイルスなど、腫瘍特異的プロモーターを有しないものであってもよい。

【００５０】
本発明の癌遺伝子治療薬において、免疫処置用ウイルスの投与量、ウイルス感染キャリアー細胞の投与量などは、患者のウイルスに対する抗体価、腫瘍の大きさ・種類、症状の程度、患者の年齢、体重などに応じて適宜選択すればよい。通常の場合、例えば免疫処置用ウイルス１回の投与量を、およそ10^{8}ウイルス粒子以上10^{11}ウイルス粒子以下に設定することができる。また、免疫処置用ウイルス投与からキャリアー細胞投与までの期間をおよそ２週間以上３ヶ月以下に、キャリアー細胞によるオンコリティックウイルスの１回の投与量をおよそ10^{11}ウイルス粒子以上10^{13}ウイルス粒子以下に、キャリアー細胞に対するオンコリティックウイルスの感染量を、およそ５vp/cell以上２０００vp/cell以下に設定することができる。

【００５１】
勿論、本発明の第一の癌遺伝子治療薬と同様に、ウイルス感染キャリアー細胞は数回にわたり患者に投与してもよいし、複数回のクールに分け、一クール当たりの投与回数、投与間隔などを任意に設定してもよい。

【００５２】
本発明の第二の癌遺伝子治療薬の具体例としては、（１）免疫処置用ウイルスとキャリアー細胞とを組み合わせたもの、（２）さらに、キャリアー細胞に感染させるオンコリティックウイルスを組み合わせたもの、（３）上記（１）又は（２）の組み合わせに、さら

に、ウイルス産生量を高めるための鉄剤および／又はポルフィリン化合物を組み合わせたもの、（４）上記（１）～（３）の組み合わせに、保存、感染・培養、医薬製剤の調製などに必要な化合物（試薬、緩衝液、酵素等）、または容器（反応用、感染・培養用、保存用等）などを組み合わせたもの、を挙げることができる。

【００５３】

同様に、前述の本発明の第一の癌遺伝子治療薬の具体例としては、（１）特定のキャリアー細胞、（２）さらに、キャリアー細胞に感染させるオンコリティックウイルスを組み合わせたもの、（３）上記（１）又は（２）の組み合わせに、さらに、ウイルス産生量を高めるための鉄剤および／又はポルフィリン化合物を組み合わせたもの、（４）上記（１）～（３）の組み合わせに、保存、感染・培養、医薬製剤の調製などに必要な化合物（試薬、緩衝液、酵素等）、または容器（反応用、感染・培養用、保存用等）などを組み合わせたもの、を挙げることができる。

【実施例】

【００５４】

以下、図面を参照しながら本発明の実施例について説明するが、本発明はこれら実施例によって何ら限定されるものではない。

【００５５】

〔実施例１：キャリアー細胞の選別と、抗体存在下における抗腫瘍効果〕

既存の癌細胞株のうち、キャリアー細胞として強力な癌細胞増殖抑制効果を発揮する細胞株を選別するため、以下の実験を行った。

【００５６】

キャリアー細胞に感染させるオンコリティックウイルスには、アデノウイルスＡｄＥ３－ＩＡＩ．３Ｂを使用した。このアデノウイルスＡｄＥ３－ＩＡＩ．３Ｂは、Ｅ１Ａ遺伝子およびＥ３遺伝子を有し、かつ、Ｅ１Ａ遺伝子の上流に腫瘍特異的プロモーターとして卵巣癌特異的ＩＡＩ．３Ｂプロモーターを有するアデノウイルスである。このアデノウイルスＡｄＥ３－ＩＡＩ．３Ｂを種々のキャリアー細胞に対し５００vp/cellで２日間感染させた後、同キャリアー細胞を培養２日目の卵巣癌細胞株ＨＥＹに加え、培養５日目に同細胞株ＨＥＹのin vitro増殖抑制効果を調査した。

【００５７】

上記実験結果を図１に示す。同図グラフの縦軸は、各細胞株について５０％の増殖抑制効果（ＩＣ５０）が得られる細胞数を示し、細胞数が少ない細胞株ほど増殖抑制効果が高いことになる。同図に示すように、今回調査した癌細胞株では、２９３細胞、Ａ５４９細胞、ＳＷ６２６細胞、ＨＴ―ＩＩＩ細胞の順に高い抗腫瘍効果を示した。２９３細胞、Ａ５４９細胞およびＳＷ６２６細胞は、従来キャリアー細胞として使用されていたＰＡ－１細胞に比べて、およそ１００倍程度の高い増殖抑制効果を示した。ＨＴ―ＩＩＩ細胞についても、ＳＷ６２６細胞と同程度の高い増殖抑制効果を示した。

【００５８】

次に、オンコリティックウイルス単独の場合とキャリアー細胞を用いた場合とで、ウイルス抗体存在下、増殖抑制効果がどのように変化するかを調べた。キャリアー細胞には２９３細胞を用い、この２９３細胞に上記アデノウイルスＡｄＥ３－ＩＡＩ．３Ｂを２日間感染させ、得られたアデノウイルスＡｄＥ３－ＩＡＩ．３Ｂ感染２９３細胞およびその細胞上清（AdE3-IAI3B 293 cell+SUPT）を、抗アデノウイルス抗体存在下、１２ウェルプレートに投与した。各ウェルには前日に５万個程度の卵巣癌細胞株ＨＥＹがまき込まれている。抗アデノウイルス抗体には、６００倍の抗体価を有するものを様々な抗体価に希釈して用いた。同様に、オンコリティックウイルス単独の場合として、アデノウイルスＡｄＥ３－ＩＡＩ．３Ｂを、抗アデノウイルス抗体存在下、１ウェル１０００vp/cellで１２ウェルプレートに投与した。そして、それぞれの場合において培養５日目に癌細胞（ＨＥＹ細胞）の増殖抑制効果を調べた。

【００５９】

上記実験結果を図２に示す。同図グラフの縦軸は、５０％の増殖抑制効果（ＩＣ５０）

が得られるときの抗アデノウイルス抗体の希釈度を示す。つまり、２９３細胞を用いた場合は、５倍程度の希釈（１２０倍の抗体価）でも５０％の増殖抑制効果が得られ、アデノウイルス単独の場合は、６００倍程度の希釈（１倍の抗体価）によって５０％の増殖抑制効果が得られた。このように、キャリアー細胞を用いた場合は、抗体価の高い条件下においても増殖抑制効果を発揮することが示された。

【００６０】

同様に、抗アデノウイルス抗体存在下、ＨＥＹ細胞に対する増殖抑制効果を、(1)アデノウイルス感染２９３細胞の上清と細胞成分（AdE3-IAI3B 293 cell+SUPT）、(2)アデノウイルスを含む細胞上清（AdE3-IAI3B, SUPT）、(3) アデノウイルスを含む細胞上清を０．２μｍのフィルターで処理したもの（AdE3-IAI3B, SUPT, filter）、(4)アデノウイルス単独（AdE3-IAI3B）、のそれぞれの場合について調べた。その結果を図３に示す。同図グラフの縦軸は、５０％の増殖抑制効果（ＩＣ５０）が得られるときの抗アデノウイルス抗体の希釈度を示す。同図に示すように、キャリアー細胞（２９３細胞）を用いた場合に、他の場合と比べてより強力な抗腫瘍効果が得られた。

【００６１】

さらに上記と同様の実験で、２９３細胞、Ａ５４９細胞、ＳＷ６２６細胞、ＨＴ—ＩＩＩ細胞の各キャリアー細胞について、100μl/wellの抗アデノウイルス抗体存在下（Ａｂ（+））、または非存在下（Ａｂ（－））における、癌細胞株ＨＥＹ細胞に対する増殖抑制効果を検討した。その結果を図４に示す。同図グラフの縦軸は、培養５日目の癌細胞数を示す。同図に示すように、上記４種類の細胞のうち、Ａ５４９細胞をキャリアー細胞に用いた場合に最も強力な増殖抑制効果を示した。即ち、充分量の抗アデノウイルス中和抗体存在下にアデノウイルス感染Ａ５４９細胞を投与すると、標的癌細胞の増殖は抗体存在下にもかかわらずほぼ完全に抑制された。他の３種類の細胞についても、抗体存在下、充分な増殖抑制効果が得られた。

【００６２】

ウイルスによる癌遺伝子治療は、抗体産生により頻回投与ができないことが難点とされていたが、キャリアー細胞を用いることで、細胞間相互作用により標的癌細胞に直接的に感染が成立することによって、頻回投与が可能となる。さらに、キャリアー細胞として上記４種類の細胞を用いることで、強力な抗腫瘍効果を得ることができる。

【００６３】

〔実施例２：ヌードマウス皮下腫瘍モデルにおけるin vivo抗腫瘍効果〕

次に、ヌードマウス皮下腫瘍モデルを用いて本発明の癌遺伝子治療薬のin vivo抗腫瘍効果を検討した。実験では、生後５週のヌードマウスの皮下にヒト卵巣癌細胞ＲＭＧ－１を移植し、４週間後、直径約１０－１５ｍｍになった巨大腫瘍に対し、本発明の癌遺伝子治療薬を６回腫瘍内注射し、腫瘍体積の変化を観察した。その結果を図５のグラフに示す。グラフ中、黒四角印の「control」はＰＢＳ緩衝液を６回腫瘍内注射した結果、黒丸印の「AdE3-IAI.3B」は上記アデノウイルスＡｄＥ３－ＩＡＩ．３Ｂをマウス１匹に1×10^{10}ウイルス粒子投与した結果、黒三角印はアデノウイルスＡｄＥ３－ＩＡＩ．３Ｂを２５０vp/cell感染させたＳＷ６２６細胞をマウス１匹に1×10^{7}個投与した結果、黒菱形印はアデノウイルスＡｄＥ３－ＩＡＩ．３Ｂを２５vp/cell感染させた２９３細胞をマウス１匹に1×10^{7}個投与した結果、白四角印はアデノウイルスＡｄＥ３－ＩＡＩ．３Ｂを５０vp/cell感染させたＡ５４９細胞をマウス１匹に1×10^{7}個投与した結果、である。同図に示すように、２９３細胞およびＡ５４９細胞をキャリアー細胞に用いた場合は、投与後５０日経過すると、直径約１０－１５ｍｍの巨大腫瘍が完全に消退した。ＳＷ６２６細胞は、９８%の増殖抑制効果を示した。

【００６４】

上記と同様の実験を、生後５週のヌードマウスの皮下にヒト卵巣癌細胞ＰＡ－１を移植して行った。その結果を図６に示す。同図に示すように、２９３細胞およびＡ５４９細胞をキャリアー細胞に用いると、直径約１０－１５ｍｍの巨大腫瘍が完全に消退した。ＳＷ６２６細胞は、５匹中４匹のマウスにおいて腫瘍が完全に消失した。

【００６５】
〔実施例３：免疫力のある皮下腫瘍モデルマウスにおけるin vivo抗腫瘍効果〕
次に、免疫機能が正常な（C57black×C3H/He）F1マウスを用いて本発明の癌遺伝子治療薬のin vivo抗腫瘍効果を検討した。本実験では、(1) syngenicモデルマウスに対し同種の卵巣癌細胞ＯＶＨＭを皮下移植し、その１０日後以降、上記アデノウイルスＡｄＥ３－ＩＡＩ．３Ｂを５０vp/cell感染させた放射線治療後のＡ５４９細胞を５回腫瘍内投与した場合、(2) 生後７週のsyngenicモデルマウスを免疫処置用ウイルスであるアデノウイルス投与により予め免疫し、その３ヶ月後、上記(1)の場合と同様に、卵巣癌細胞ＯＶＨＭを皮下移植し、その１０日後以降、上記アデノウイルスＡｄＥ３－ＩＡＩ．３Ｂを５０vp/cell感染させた放射線治療後のＡ５４９細胞を５回腫瘍内投与した場合、(3) コントロールとしてＰＢＳ緩衝液を５回腫瘍内投与した場合、のそれぞれの場合について抗腫瘍効果を検討した。
【００６６】
上記実験結果を図７のグラフに示す。グラフ中、黒四角印の「control」は上記(3)のコントロールの場合の結果であり、黒丸印の「Ad(-)→A549」は上記(1)の免疫処置用アデノウイルスを投与しなかった場合の結果であり、黒三角印の「Ad(+)→A549」は上記(2)の免疫処置用アデノウイルスを投与した場合の結果である。なお、免疫処置用アデノウイルスには、Ｅ１遺伝子を有しない非増殖型のアデノウイルスを使用し、より具体的には、ＣＭＶプロモーターの下流にＬａｃＺ遺伝子が挿入されたアデノウイルスを使用した。同図に示すように、予めアデノウイルスによる免疫をしていない上記(1)の場合では、コントロールに比べて２０％の抗腫瘍効果を示したのに対し、予めアデノウイルスによる免疫処置を施した上記(2)の場合では、投与開始後３－４日で明らかな抗腫瘍効果を示し、９日後に腫瘍は完全に消失し、リンパ節転移も消失した。このように、抗体産生があるにも関わらずむしろ免疫力のあるマウスでより強力かつ劇的な抗腫瘍効果が得られたのは、免疫処置用アデノウイルスの投与によって生体のＣＴＬ反応が誘導・惹起されたためと考えられる。
【００６７】
オンコリティックアデノウイルスは、細胞間相互作用によりキャリアー細胞から標的腫瘍細胞へと感染し、腫瘍細胞内で特異的に増殖し、腫瘍細胞を融解・殺傷するcell lysis作用を発揮すると考えられるが、本発明の癌遺伝子治療薬においては、予め免疫処置用アデノウイルスを投与することによって、オンコリティックアデノウイルスに感染した標的腫瘍細胞を排除する生体の強いＣＴＬ反応が誘導され、アデノウイルス感染腫瘍細胞の完全な自然排除が誘導されると考えられる。
【００６８】
標的腫瘍細胞へのアデノウイルスの感染方法の１つとして、アデノウイルスによる細胞融合が考えられる。図８は、Ａ５４９細胞をまき込んだウェルに、紫外線照射により不活化したアデノウイルスを１細胞当たり１００００ウイルス粒子投与し、一晩培養後、顕微鏡により観察した結果を示すものである。同図矢印に示すように、アデノウイルスの投与によって細胞融合が起こり、多核細胞が散見された。アデノウイルスを投与しなかったＡ５４９細胞では、このような変化は観察されなかった（図９参照）。
【００６９】
細胞融合以外に考えられる感染方法としては、キャリアー細胞の標的細胞への細胞接着さらに局所的なアデノウイルスのバーストあるいはアデノウイルスを含むキャリアー細胞fragementによる標的腫瘍細胞へのアデノウイルスの感染が成立すると考えられる。何れの方法にせよ、アデノウイルスに感染した標的腫瘍細胞においては、腫瘍特異的プロモーターを有するアデノウイルスが増加し強力な免疫原となって（あるいはアデノウイルスに感染した標的腫瘍細胞が有する癌特異的ペプチドを二次的に抗原認識することによって）、ＣＴＬ反応により腫瘍細胞が排除されると考えられる。
【００７０】
〔実施例４：ミッドカインプロモーターを使用した場合の抗腫瘍効果〕

次に、ミッドカインプロモーターを使用した場合の抗腫瘍効果を検討した。図１０（ａ）は、１～２１のヒト手術標本におけるミッドカイン（ＭＫ）ｍＲＮＡの発現をＲＴ－ＰＣＲで検討した結果である。同図に示すように、神経膠芽腫（glioblastoma）、未分化星細胞腫（anaplastic astrocytoma）といった悪性グリオーマ（malignant glioma）および瀰漫性星細胞腫（diffuse astrocytoma）においてミッドカインｍＲＮＡの過剰発現が認められた。このように、ミッドカインは脳腫瘍など多くの癌において過剰発現が認められる。

【００７１】

図１０（ｂ）は、上記と同様の方法により、悪性グリオーマの４つの細胞株におけるミッドカインｍＲＮＡの発現をＲＴ－ＰＣＲで検討した結果である。同図に示すように、４つの細胞株のうち、Ｕ８７ＭＧでは発現はなく、Ｕ２５１ＭＧ、ＬＮ３１９、Ｕ３７３ＭＧではミッドカインｍＲＮＡの過剰発現が認められた。

【００７２】

図１０（ｃ）は、上記各細胞株におけるミッドカイン蛋白の発現をウエスタンブロット解析によって検討した結果であり、ｍＲＮＡと同様にＵ８７ＭＧでは発現はなく、Ｕ２５１ＭＧ、ＬＮ３１９、Ｕ３７３ＭＧではミッドカイン蛋白の過剰発現が認められた。

【００７３】

次に、ミッドカインのプロモーターアッセイを行った。実験では、長さが異なる２つのミッドカインプロモーター（６００塩基と２３００塩基）の活性を比較した。それぞれのプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子が挿入されたプラスミド（pGL3-MK600およびpGL3-MK2300）を上記各細胞株に導入し、それぞれのルシフェラーゼ活性を調べることによりプロモーター活性を評価した。その結果、図１１に示すように、悪性グリオーマの細胞株では、長さ６００塩基のほうが長さ２３００塩基より高いプロモーター活性を示した。

【００７４】

図１２（ａ）は、今回設計した、ミッドカインプロモーターを有するオンコリティック（細胞融解型）アデノウイルスの構造を模式的に示す図である。長さ６００塩基または２３００塩基のミッドカインプロモーターは、５５２ｂｐの位置に導入された。

【００７５】

図１２（ｂ）は、３種類のアデノウイルスを上記各細胞株に感染させ、それぞれの細胞株におけるＥ１Ａ蛋白の発現をウエスタンブロット解析によって検討した結果である。同図に示すように、長さ６００塩基のミッドカインプロモーターを有するアデノウイルス（ＡｄＭＫ６００）を感染させた場合、ミッドカインを発現するＵ２５１ＭＧ、ＬＮ３１９、Ｕ３７３ＭＧでのみアデノウイルスのＥ１Ａ蛋白の発現が観察された。これに対して、野生型のアデノウイルス（ＡｄＷｉｌｄ）では正常脳細胞を含めすべての細胞にＥ１Ａ蛋白の発現が観察され、コントロールウイルスであるＡｄＬａｃＺではいずれの細胞においてもＥ１Ａ蛋白の発現が観察されなかった。

【００７６】

図１３（ａ）は、３種類のアデノウイルスによる癌細胞増殖抑制効果を比較検討した結果である。野生型のアデノウイルス（ＡｄＷｉｌｄ）ではすべての細胞において強い増殖抑制効果を示したが、ミッドカインプロモーターを有するアデノウイルス（ＡｄＭＫ６００およびＡｄＭＫ２３００）では、ミッドカインを発現するＵ２５１ＭＧ、ＬＮ３１９、Ｕ３７３ＭＧにおいてのみ増殖抑制効果を示し、これらの値は、ミッドカインｍＲＮＡの発現量、プロモーター活性とよく相関した。また、長さ２３００塩基のミッドカインプロモーターを有するアデノウイルスＡｄＭＫ２３００よりＡｄＭＫ６００のほうが強い増殖抑制効果を示した。

【００７７】

図１３（ｂ）は、アデノウイルスのＥ３領域の増殖抑制効果に与える影響を検討した結果であり、同図に示すように、Ｅ３領域のあるＡｄＭＫ６００ではＥ３領域のないアデノウイルス（ＡｄＭＫ６００―ΔＥ３）より１０倍程度の強い増殖抑制効果を示した。

【００７８】
図１３（ｃ）は、ヌードマウス皮下移植モデルにおけるアデノウイルスの抗腫瘍効果を検討した結果である。図中、黒菱形印は野生型のアデノウイルスＡｄＷｉｌｄを投与した結果、黒四角印はミッドカインプロモーターを有するアデノウイルスＡｄＭＫ６００を投与した結果、黒三角印はＬａｃＺ遺伝子が挿入されたアデノウイルスＡｄＬａｃＺを投与した結果、黒丸印はＰＢＳ緩衝液のみ投与した結果である。同図に示すように、ミッドカインを発現しないＵ８７ＭＧでは野生型のアデノウイルスのみ抗腫瘍効果を示し、ミッドカインを発現するＵ３７３ＭＧではＡｄＭＫ６００とＡｄＷｉｌｄは完全に腫瘍の消失をもたらし、ＰＢＳ緩衝液のみ注射したコントロールとＡｄＬａｃＺを注射したものとの間には大きな差異は認められなかった。
【００７９】
さらに、上記ミッドカインプロモーターを有するアデノウイルス（Ａｄ-ＭＫ６００）をキャリアー細胞に感染させ本発明の癌遺伝子治療薬を調製し、その抗腫瘍効果をＡｄ-ＭＫ６００単独投与の場合と比較した。実験では、２９３細胞およびＡ５４９細胞をキャリアー細胞に使用した。ヌードマウス５週令に上記Ｕ３７３ＭＧ細胞を移植し、３週間後に１０－１５ｍｍの腫瘍が得られた後、本発明の癌遺伝子治療薬またはＡｄ-ＭＫ６００のみを投与し、その４週間後に腫瘍体積の大きさを比較した。その結果を図１４に示す。図中、「Ad-MK600」はＡｄ-ＭＫ６００を単独投与した結果、「293」「A549」はそれぞれ２９３細胞、Ａ５４９細胞をキャリアー細胞に用いた本発明の癌遺伝子治療薬を投与した結果である。同図に示すように、本発明の癌遺伝子治療薬を投与したときは完全に腫瘍が消失した。一方、Ａｄ-ＭＫ６００を単独投与したときはコントロール（control）と殆ど差は認められなかった。
【００８０】
〔実施例５：アデノウイルスAdE3-IAI.3Bの増殖抑制効果に対するＦｅおよびＡＬＡの影響〕
卵巣癌細胞ＨＥＹを１２well dishに10000/well播いた後、翌日に$FeSO_4$を50μg/ml、5μg/ml、0.5μg/ml、0μg/mlの各濃度において入れ、全てのwellに細胞障害型アデノウイルスAdE3-IAI.3Bを入れ、５日後にアデノウイルスの増殖抑制効果をＩＣ５０で評価した。その結果を図１５に示す。図中縦軸は、各場合におけるＩＣ５０のウイルス投与量（vp/cell）を相対的に示すものである。同図に示すように、$FeSO_4$ 50μg/mlおよびアデノウイルスを併用した場合では、アデノウイルス単独に比べ約２０倍、$FeSO_4$ 5μg/mlおよびアデノウイルス併用では、アデノウイルス単独に比べ約８倍の増殖抑制効果を示した。
【００８１】
次に、卵巣癌細胞株ＨＥＹを１２well dishに10000/well播いた後、翌日に5-aminolevulinic acid（ＡＬＡ）を50μg/ml、5μg/ml、0.5μg/ml、0μg/mlの各濃度において入れ、全てのwellに細胞障害型アデノウイルスAdE3-IAI.3Bを入れ、５日後にアデノウイルスの増殖抑制効果をＩＣ５０で評価した。その結果を図１６に示す。図中縦軸は、各場合におけるＩＣ５０のウイルス投与量（vp/cell）を相対的に示すものである。同図に示すように、ＡＬＡ 50μg/mlおよびアデノウイルスを併用した場合では、アデノウイルス単独に比べ約１００倍の増殖抑制効果を示した。
【００８２】
さらに、卵巣癌細胞株ＨＥＹを１２well dishに10000/well播いた後、翌日に$FeSO_4$を50μg/ml、5μg/ml、0.5μg/ml、0μg/mlの各濃度において入れ、各wellに細胞障害型アデノウイルスAdE3-IAI.3Bおよび5-aminolevulinic acid（ＡＬＡ）50μg/ml、又はコントロールとしてアデノウイルス単独を入れ、５日後にアデノウイルスの増殖抑制効果をＩＣ５０で評価した。その結果を図１７に示す。図中縦軸は、各場合におけるＩＣ５０のウイルス投与量（vp/cell）を相対的に示すものである。同図に示すように、$FeSO_4$ 50μg/ml、ＡＬＡ 50μg/mlおよびアデノウイルスを併用した場合では、アデノウイルス単独に比べ、約１０００倍の増殖抑制効果を示し、$FeSO_4$ 5μg/ml、ＡＬＡ 50μg/mlおよびアデノウイルスを併用した場合では、アデノウイルス単独に比べ、約７００倍の増殖抑制効果を示

し、$FeSO_4$ 0.5μg/ml、ＡＬＡ 50μg/mlおよびアデノウイルスを併用した場合では、アデノウイルス単独に比べ、約２００倍の増殖抑制効果を示した。

【００８３】

以上のように、ＡＬＡおよびＦｅは、オンコリティックアデノウイルスAdE3-IAI.3Bの増殖抑制効果を著しく亢進することが明らかとなった。この理由は、PFU assayによりアデノウイルスの産生量の増加によることが明らかとなっており、ＡＬＡおよびＦｅは、アデノウイルスの産生量を増加させること、つまりアデノウイルスの癌細胞内における産生量増加とともに抗腫瘍効果を著しく高めることが明らかとなった。

【００８４】

ＡＬＡは、ポルフィリンで従来より癌細胞に取り込まれやすいことが知られており、代謝されてprotoporphyrin IXとなり、これが光増感作用を有することよりエキシマダイレーザーと併用され、表在性癌のＰＤＴ治療（photodynamic therapy）に用いられてきた。

【００８５】

上記protoporphyrin IXは、Ｆｅと結合することによりhemeとなり、細胞内でcytcrome等のheme蛋白を形成する。このheme蛋白は、細胞内ミトコンドリアで呼吸器系に関与しており、ＡＴＰ産生に働き蛋白合成に関与する。このように、heme蛋白は、アデノウイルス感染時のアデノウイルス産生のための蛋白合成に関与するため、これらポルフィリン代謝が亢進することは、アデノウイルス産生増加につながる可能性が高いと考えられる。

【００８６】

したがって、本発明の癌遺伝子治療薬、癌遺伝子治療方法において、これらＦｅおよび／又はＡＬＡ等のポルフィリン化合物を併用することにより、さらに治療効果を高めることが期待できる。即ち、Ｆｅおよび／又はＡＬＡ等のポルフィリン化合物を併用することにより、直接的な抗腫瘍効果の増加、さらには抗体存在下の感染抑制状態において、標的細胞のアデノウイルス産生増加によるCTL responseの亢進により、syngenic mouse modelにおいて抗腫瘍効果が高まり、ヒトにおいても同様な良好な抗腫瘍効果を呈するものと考えられる。

【００８７】

また、オンコリティックウイルスを用いた癌遺伝子治療において、キャリアー細胞を使用しない場合であっても、Ｆｅおよび／又はＡＬＡ等のポルフィリン化合物を併用することにより、治療効果を高めることが期待できる。

【産業上の利用可能性】

【００８８】

以上のように、本発明の癌遺伝子治療薬は、ほぼ全ての悪性腫瘍に適用することができ、卵巣癌、扁平上皮癌（子宮頚部癌、皮膚癌、頭頚部癌、食道癌、肺癌等）、消化器癌（大腸癌、膵癌、肝癌、胃癌等）、神経芽細胞腫、脳腫瘍、乳癌、精巣癌、前立腺癌など各種癌に対する強力な抗腫瘍効果が期待できる。

【図面の簡単な説明】

【００８９】

【図１】各種細胞株をキャリアー細胞に用いた場合の癌細胞増殖抑制効果を調べた結果を示すグラフである。

【図２】オンコリティックウイルス単独の場合とキャリアー細胞を用いた場合とで、ウイルス抗体存在下、癌細胞増殖抑制効果がどのように変化するか調べた結果を示すグラフである。

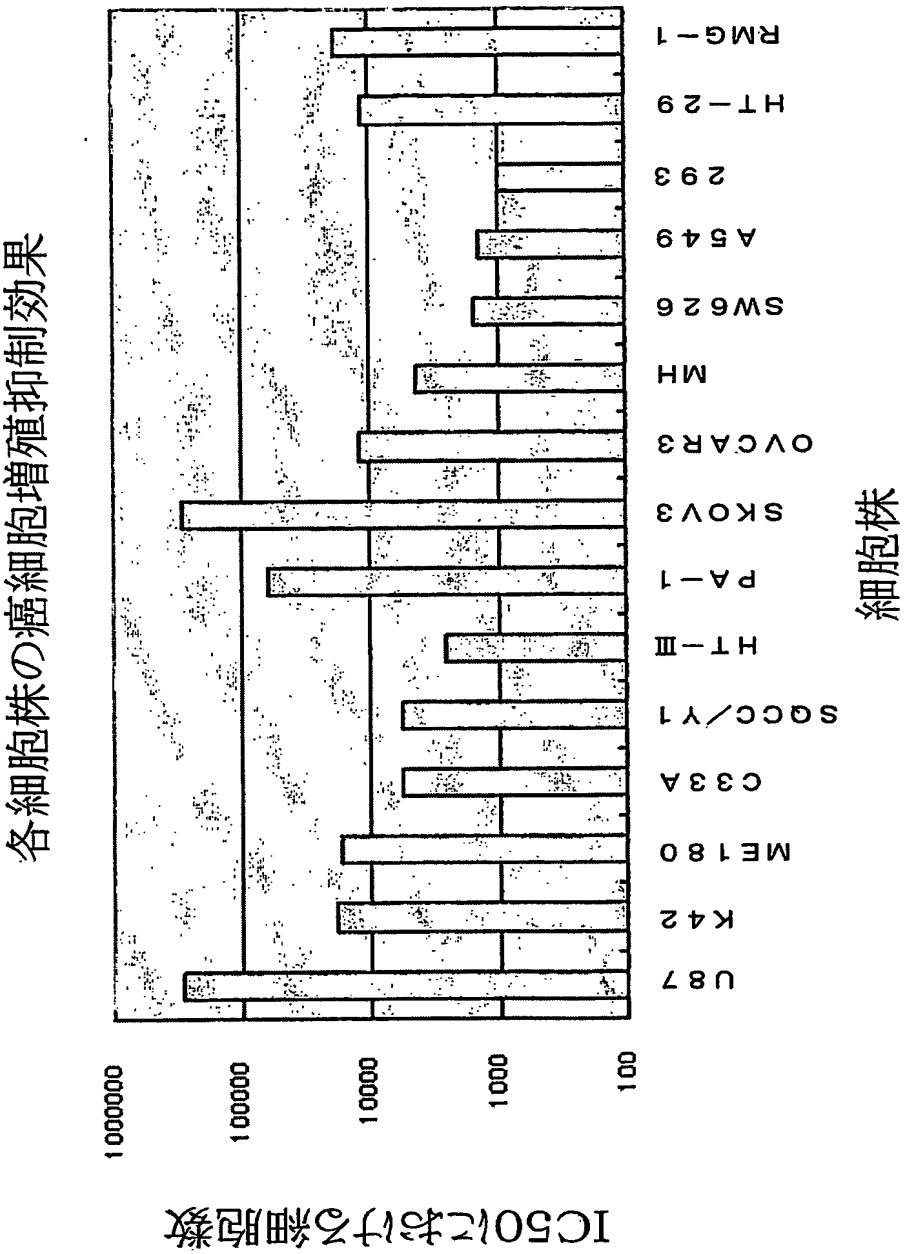
【図３】オンコリティックアデノウイルス感染２９３細胞などについて、ウイルス抗体存在下の癌細胞増殖抑制効果を調べた結果を示すグラフである。

【図４】２９３細胞、Ａ５４９細胞、ＳＷ６２６細胞、ＨＴ－ＩＩＩ細胞の各キャリアー細胞について、ウイルス抗体存在下の癌細胞増殖抑制効果を調べた結果を示すグラフである。

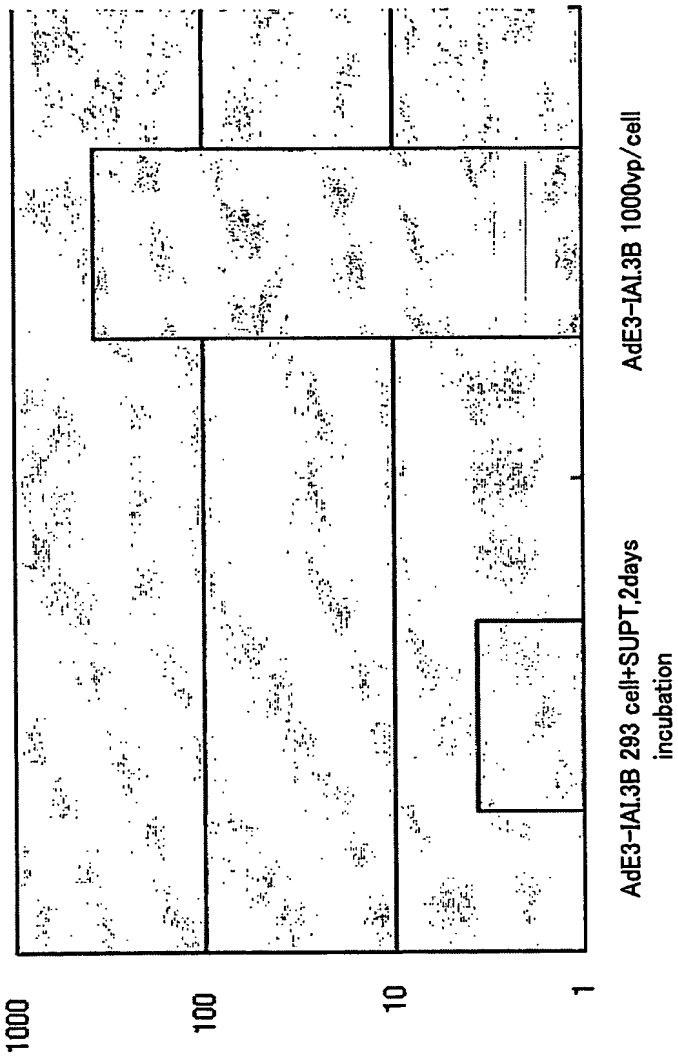
【図５】ヌードマウスの皮下にヒト卵巣癌細胞ＲＭＧ－１を移植した腫瘍モデルを用いて本発明の癌遺伝子治療薬のin vivo抗腫瘍効果を検討した結果を示すグラフであ

る。
【図６】ヌードマウスの皮下にヒト卵巣癌細胞ＰＡ－１を移植した腫瘍モデルを用いて本発明の癌遺伝子治療薬のin vivo抗腫瘍効果を検討した結果を示すグラフである。
【図７】免疫機能が正常な皮下腫瘍モデルマウスを用いて本発明の癌遺伝子治療薬のin vivo抗腫瘍効果を検討した結果を示すグラフである。
【図８】アデノウイルス投与による細胞融合を顕微鏡により観察した図である。
【図９】コントロールであり、アデノウイルスを投与しなかったＡ５４９細胞を顕微鏡により観察した図である。
【図１０】（ａ）は、１～２１のヒト手術標本におけるミッドカイン（ＭＫ）ｍＲＮＡの発現をＲＴ－ＰＣＲで検討した結果、（ｂ）は、同様の方法により、悪性グリオーマの４つの細胞株におけるミッドカインｍＲＮＡの発現をＲＴ－ＰＣＲで検討した結果、（ｃ）は、上記各細胞株におけるミッドカインの発現をウエスタンブロット解析によって検討した結果、である。
【図１１】長さが異なる２つのミッドカインプロモーターを用いて上記各細胞株におけるプロモーター活性を比較した結果を示すグラフである。
【図１２】（ａ）は、今回設計した、ミッドカインプロモーターを有するオンコリティックアデノウイルスの構造を模式的に示す図であり、（ｂ）は、３種類のアデノウイルスを上記各細胞株に感染させ、それぞれの細胞株におけるＥ１Ａ蛋白の発現をウエスタンブロット解析によって検討した結果である。
【図１３】（ａ）は、３種類のアデノウイルスによる癌細胞増殖抑制効果を比較検討した結果であり、（ｂ）は、アデノウイルスのＥ３領域の増殖抑制効果に与える影響を検討した結果であり、（ｃ）は、ヌードマウス皮下移植モデルにおけるアデノウイルスの抗腫瘍効果を検討した結果である。
【図１４】ミッドカインプロモーターを有するオンコリティックウイルスをキャリアー細胞に感染させて本発明の癌遺伝子治療薬を調製し、その抗腫瘍効果をウイルス単独投与の場合と比較した結果を示すグラフである。
【図１５】アデノウイルスAdE3-IAI.3Bの増殖抑制効果に対するＦｅの影響を検討した結果を示すグラフである。
【図１６】アデノウイルスAdE3-IAI.3Bの増殖抑制効果に対するＡＬＡの影響を検討した結果を示すグラフである。
【図１７】アデノウイルスAdE3-IAI.3Bの増殖抑制効果に対するＦｅおよびＡＬＡ両存在下の影響を検討した結果を示すグラフである。

【書類名】図面
【図１】

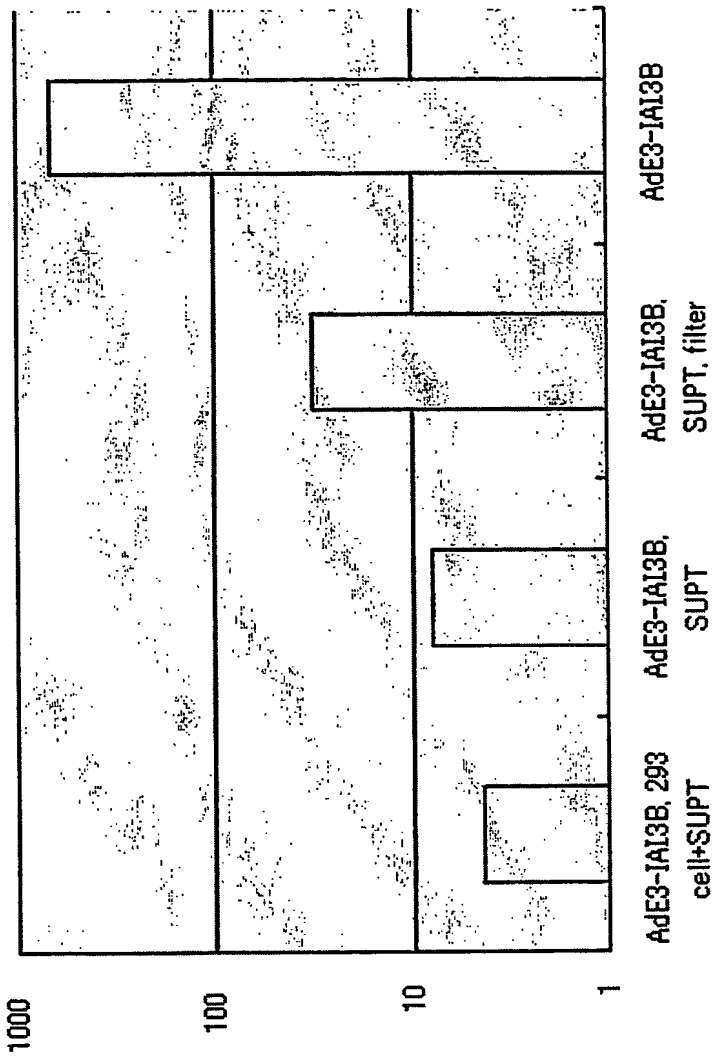

各細胞株の癌細胞増殖抑制効果
細胞株
RMG－1
HT－29
293
A549
SW626
MH
OVCAR3
SKOV3
PA－1
HT－Ⅲ
SQCC／Y1
C33A
ME180
K42
U87
1000000
100000
10000
1000
100
IC50における細胞数

【図２】

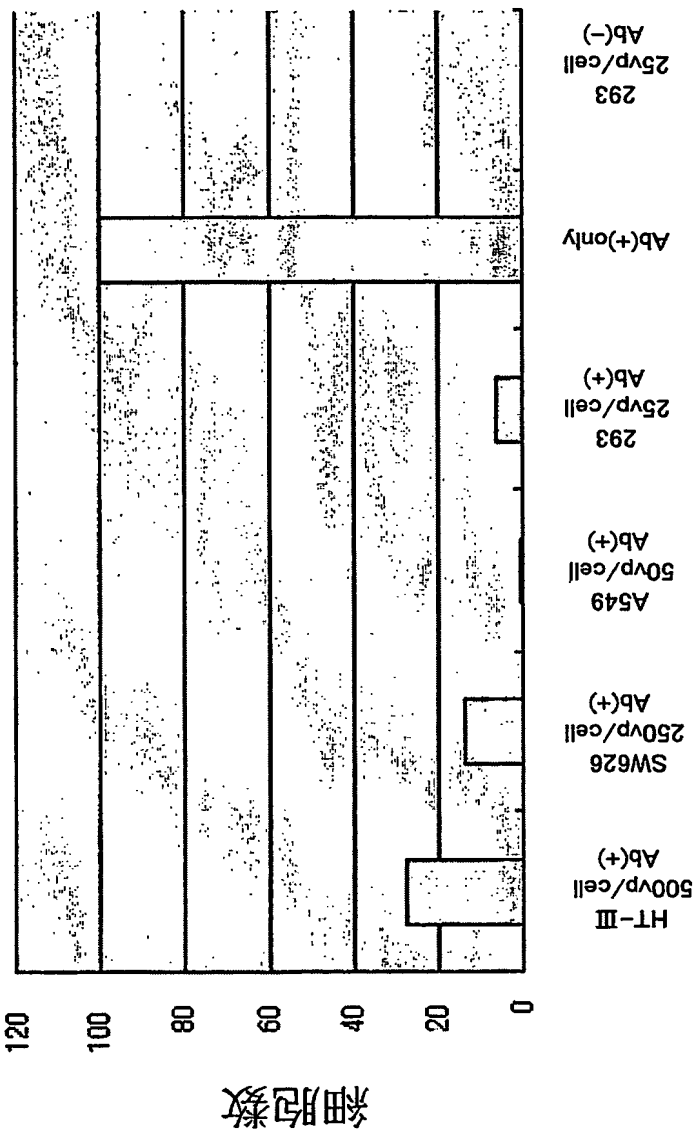


IC50における抗アデノウイルス抗体希釈度

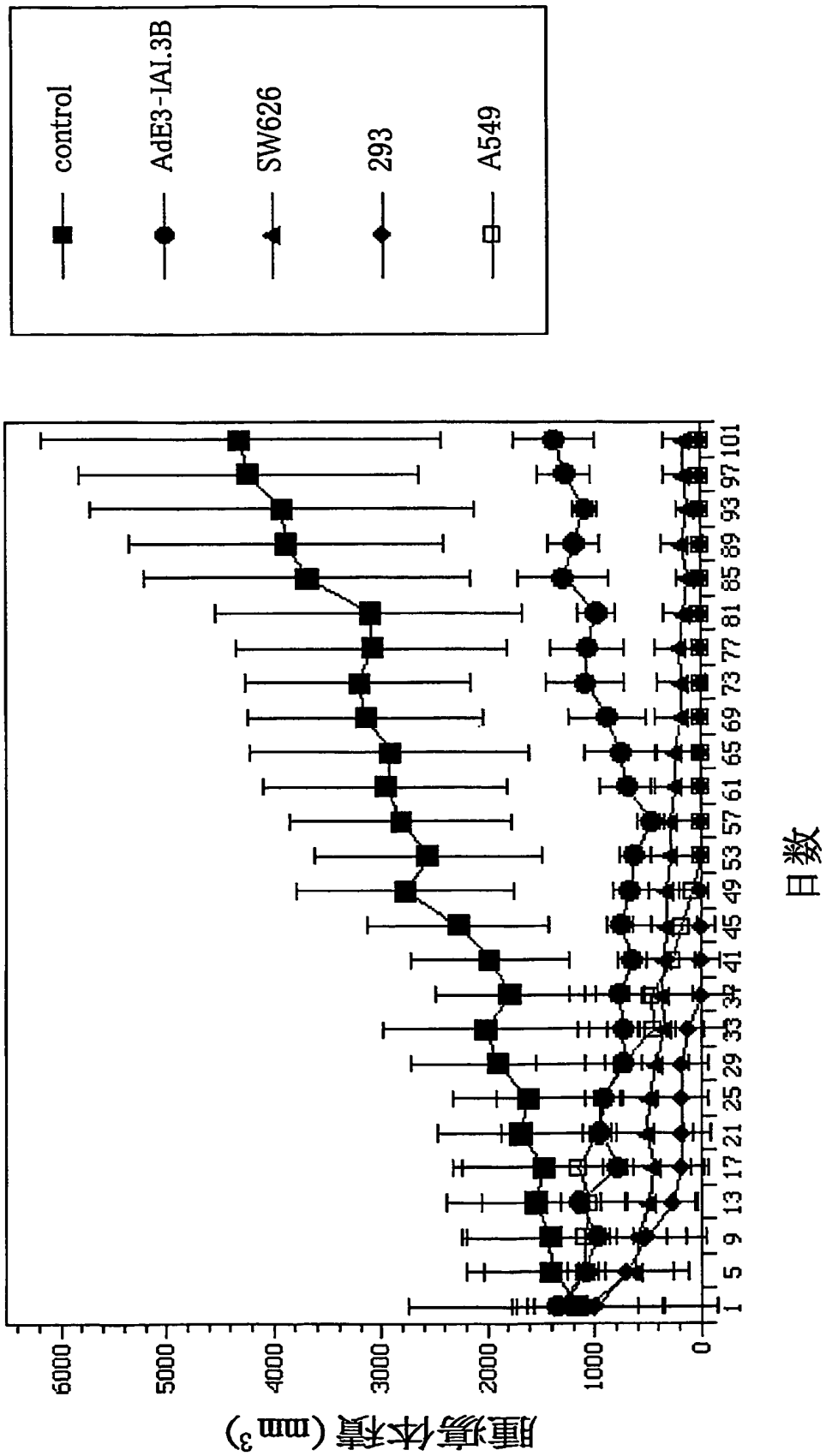
【図３】


AdE3-IA13B
AdE3-IA13B, SUPT, filter
AdE3-IA13B, SUPT
AdE3-IA13B, 293 cell+SUPT
1000
100
10
1
IC50における抗アデノウイルス抗体希釈度

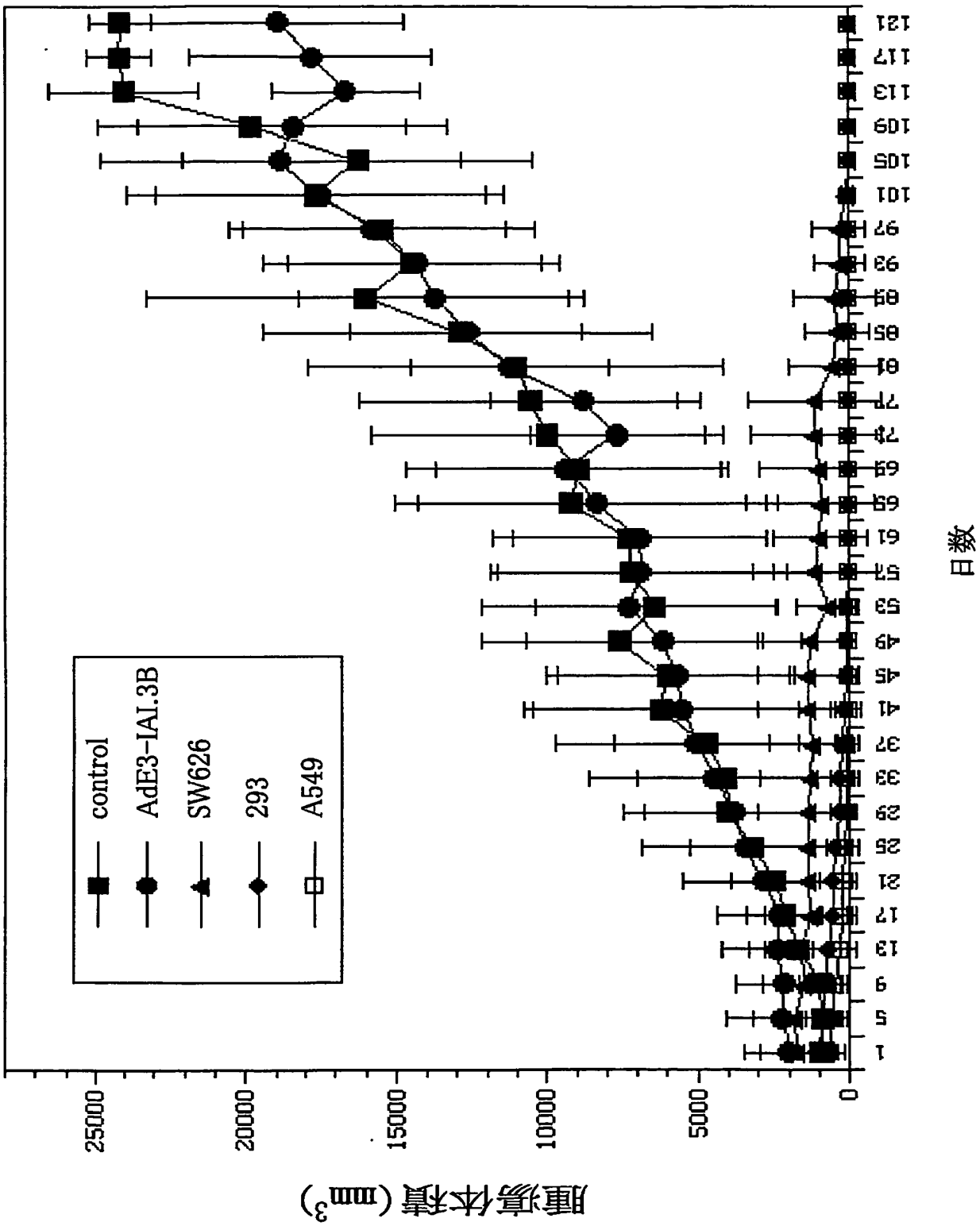
【図４】


細胞数
0
20
40
60
80
100
120
HT-III
500vp/cell
Ab(+)
SW626
250vp/cell
Ab(+)
A549
50vp/cell
Ab(+)
293
25vp/cell
Ab(+)
Ab(+)only
293
25vp/cell
Ab(−)

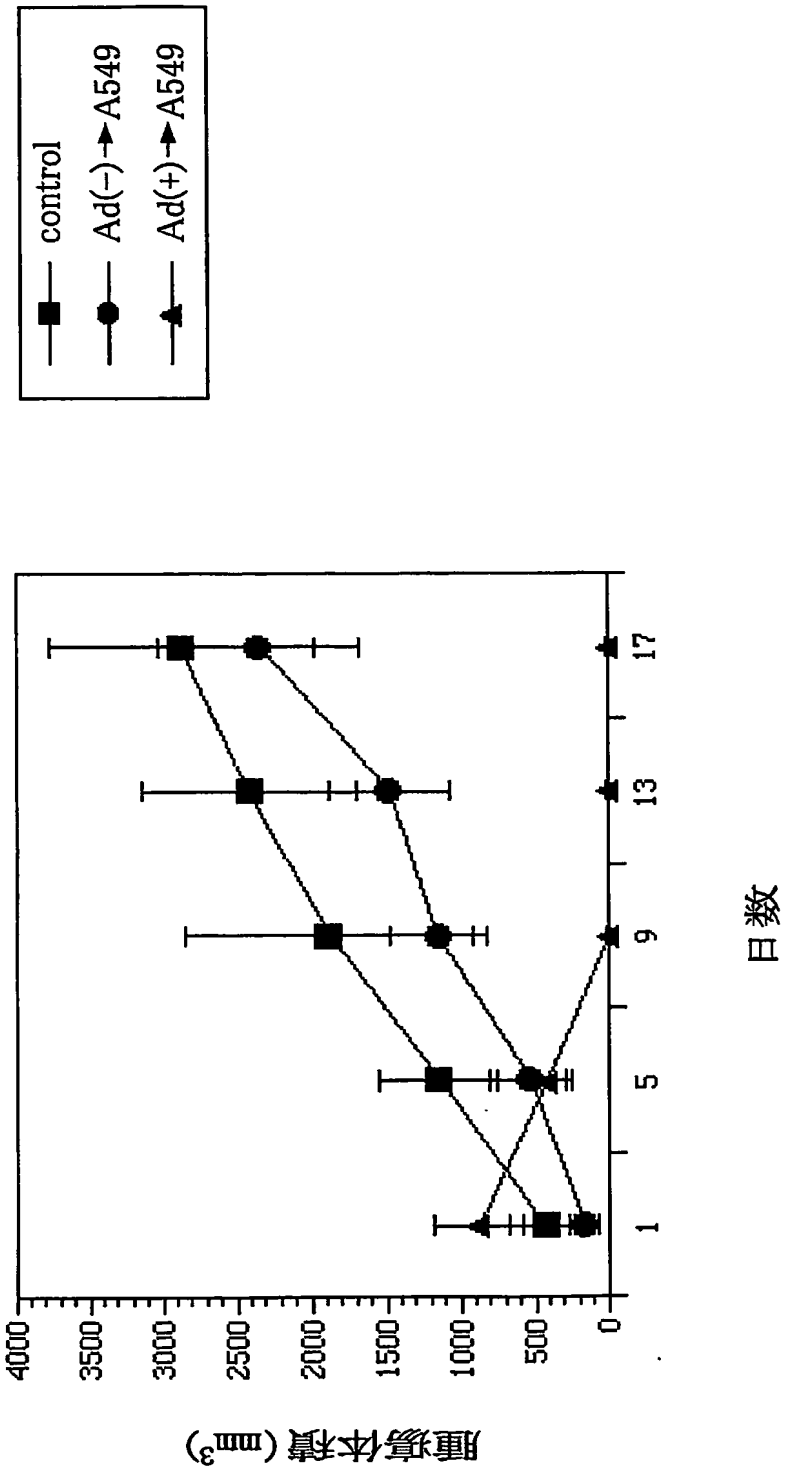
【図５】


control
AdE3-IAI.3B
SW626
293
A549
腫瘍体積 (mm3)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
1 5 9 13 17 21 25 29 33 37 41 45 49 53 57 61 65 69 73 77 81 85 89 93 97 101
日数

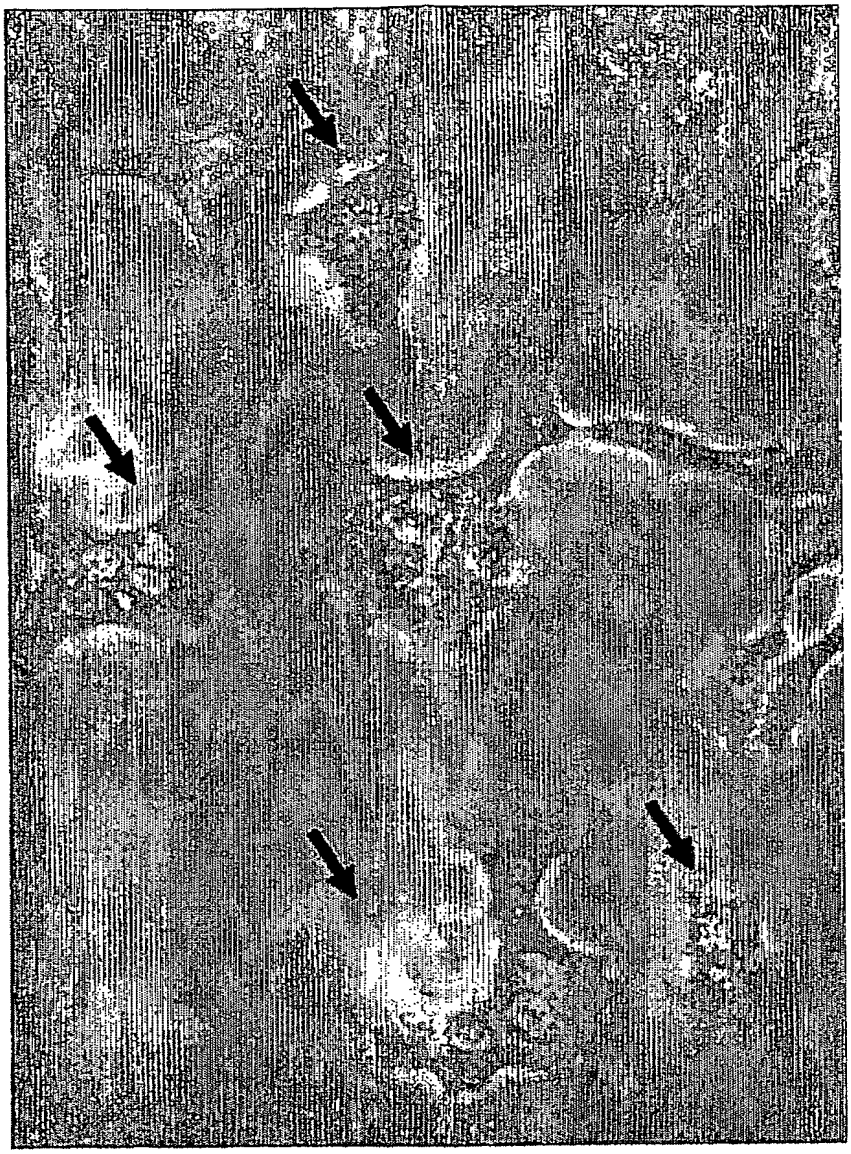
【図６】


腫瘍体積（mm3）
25000
20000
15000
10000
5000
0
日数
1
5
9
13
17
21
25
29
33
37
41
45
49
53
57
61
65
69
73
77
81
85
89
93
97
101
105
109
113
117
121
control
AdE3-IAI.3B
SW626
293
A549

【図７】


control
Ad(−)→A549
Ad(+)→A549
腫瘍体積 (mm³)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
1
5
9
13
17
日数

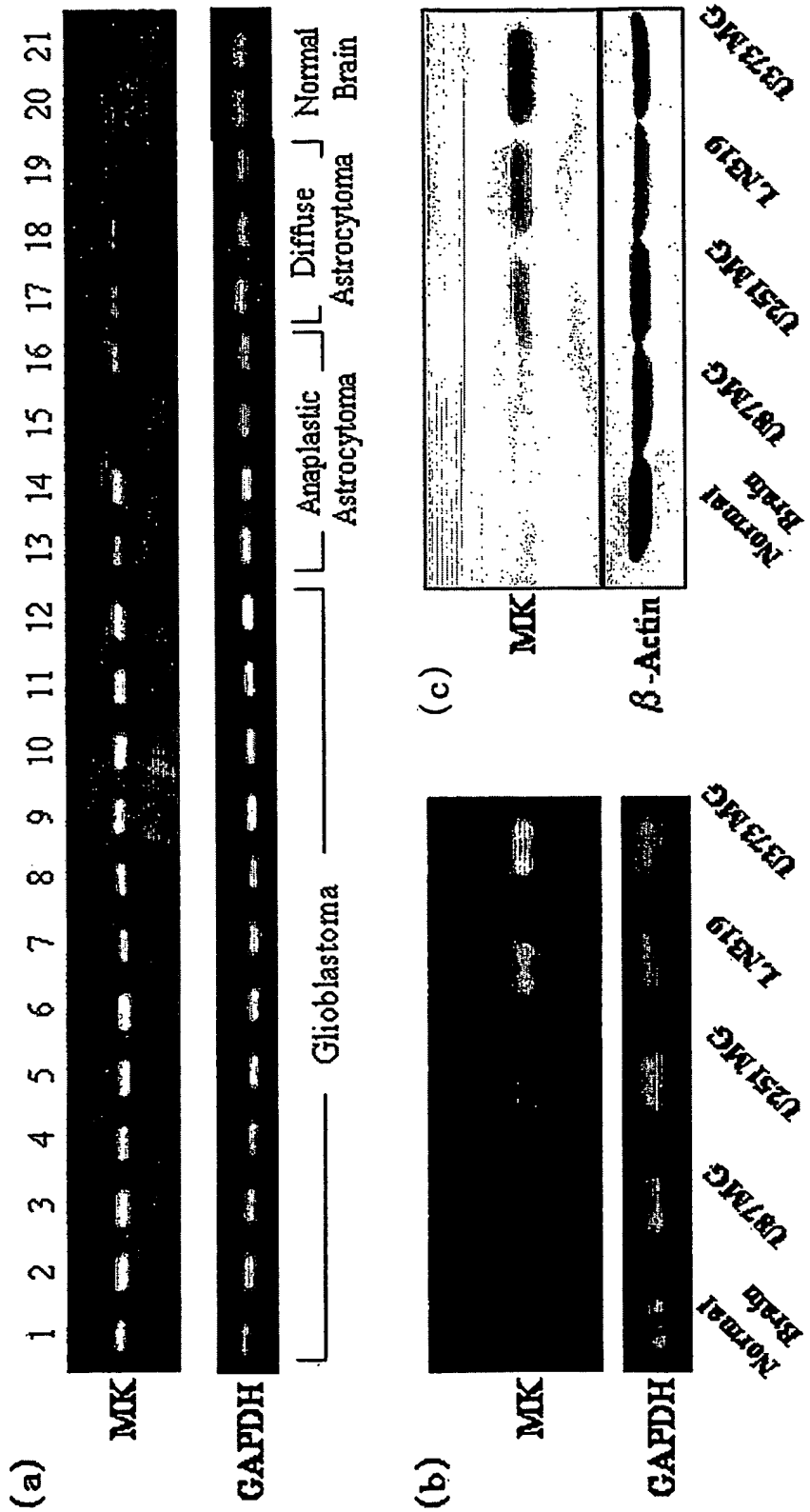
【図８】



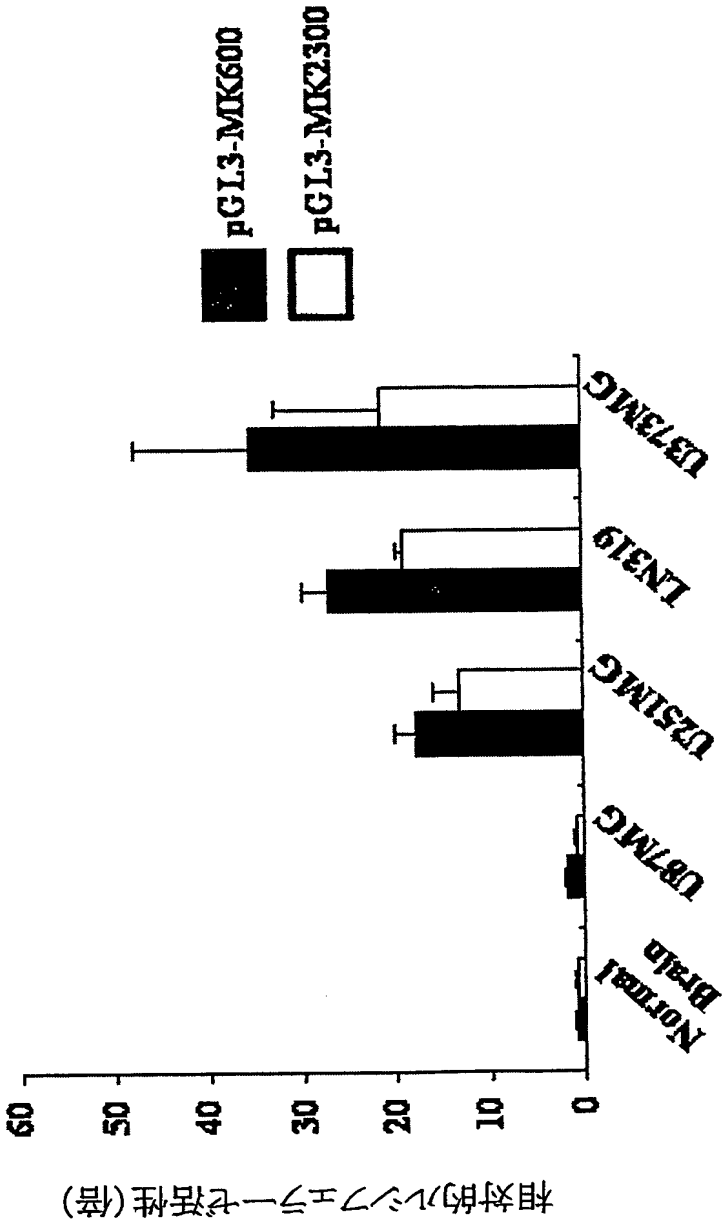
【図９】



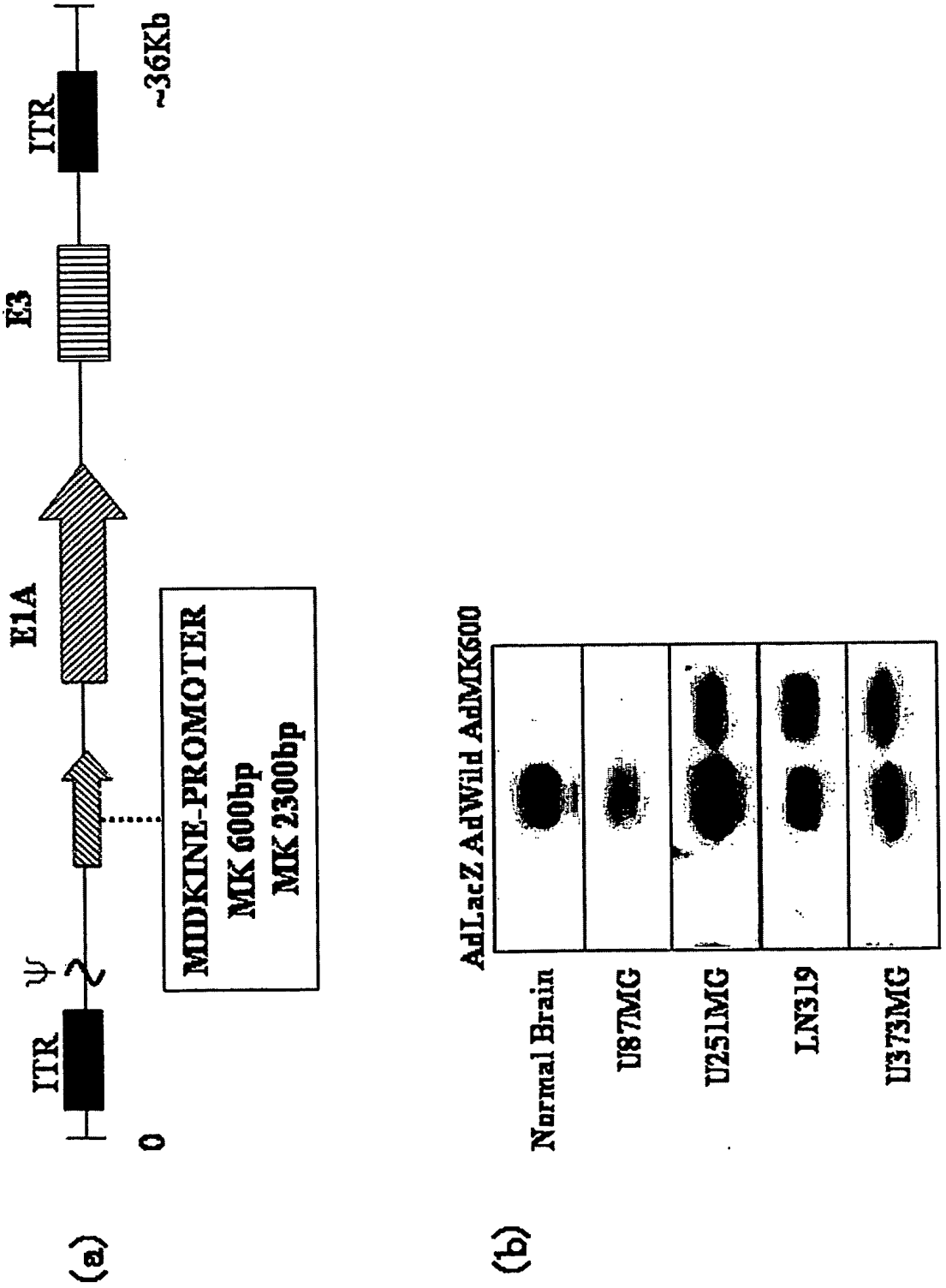
【図１０】


(a)
MK
GAPDH
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
Glioblastoma
Anaplastic Astrocytoma
Diffuse Astrocytoma
Normal Brain
(b)
MK
GAPDH
Normal Brain
U87MG
U251MG
LN19
U373MG
(c)
MK
β-Actin
Normal Brain
U87MG
U251MG
LN19
U373MG

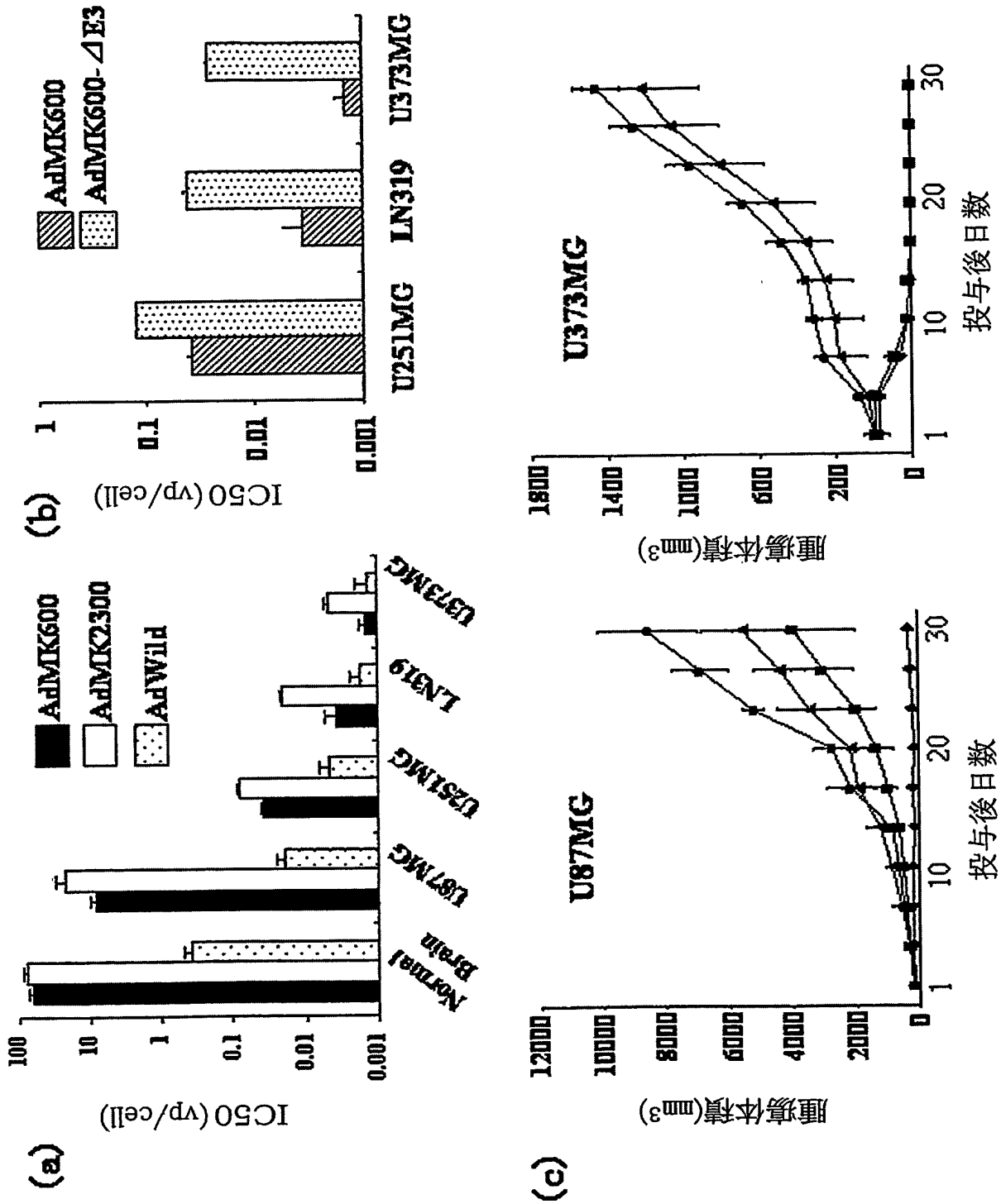
【図１１】


pGL3-MK600
pGL3-MK2300
U373MG
LN319
U251MG
U87MG
Normal Brain
0
10
20
30
40
50
60
相対的ルシフェラーゼ活性（倍）

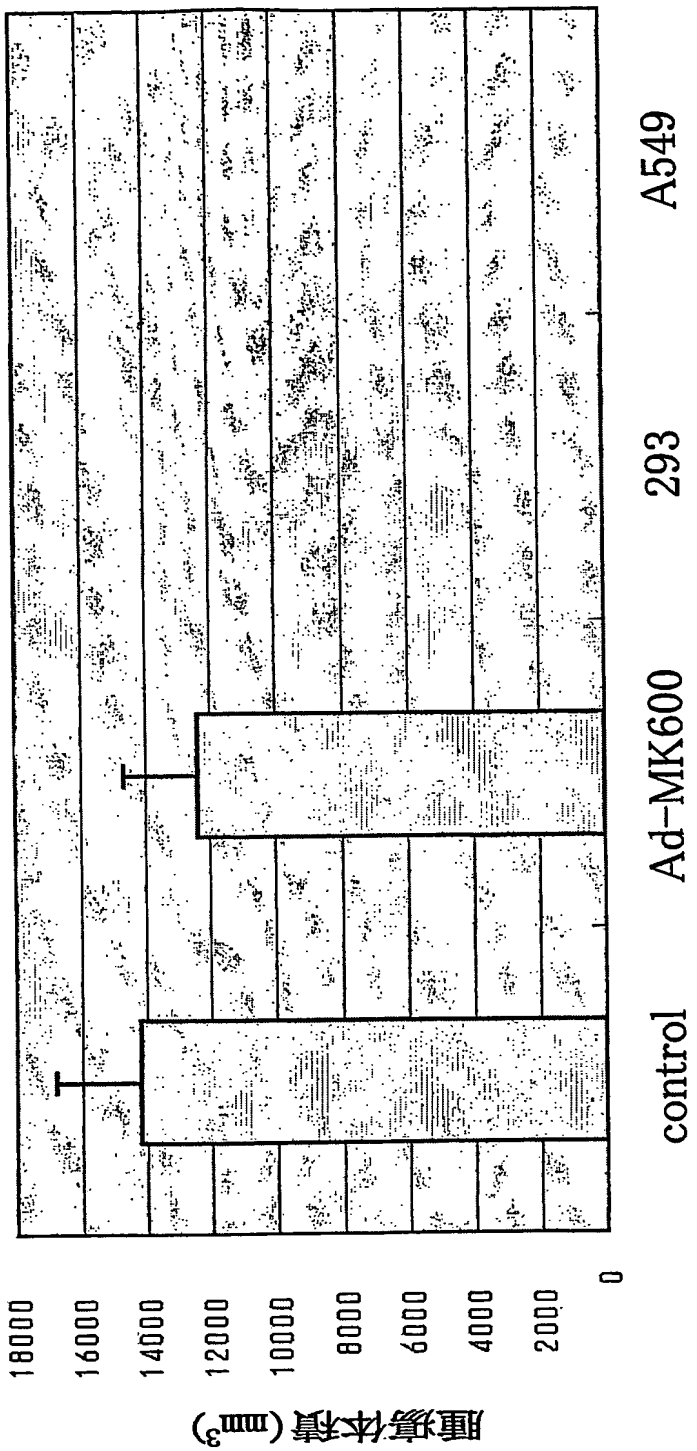
【図１２】


(a)
ITR
Ψ
E1A
E3
ITR
~36Kb
0
MIDKINE-PROMOTER
MK 600bp
MK 2300bp
(b)
AdLacZ AdWild AdMK600
Normal Brain
U87MG
U251MG
LN319
U373MG

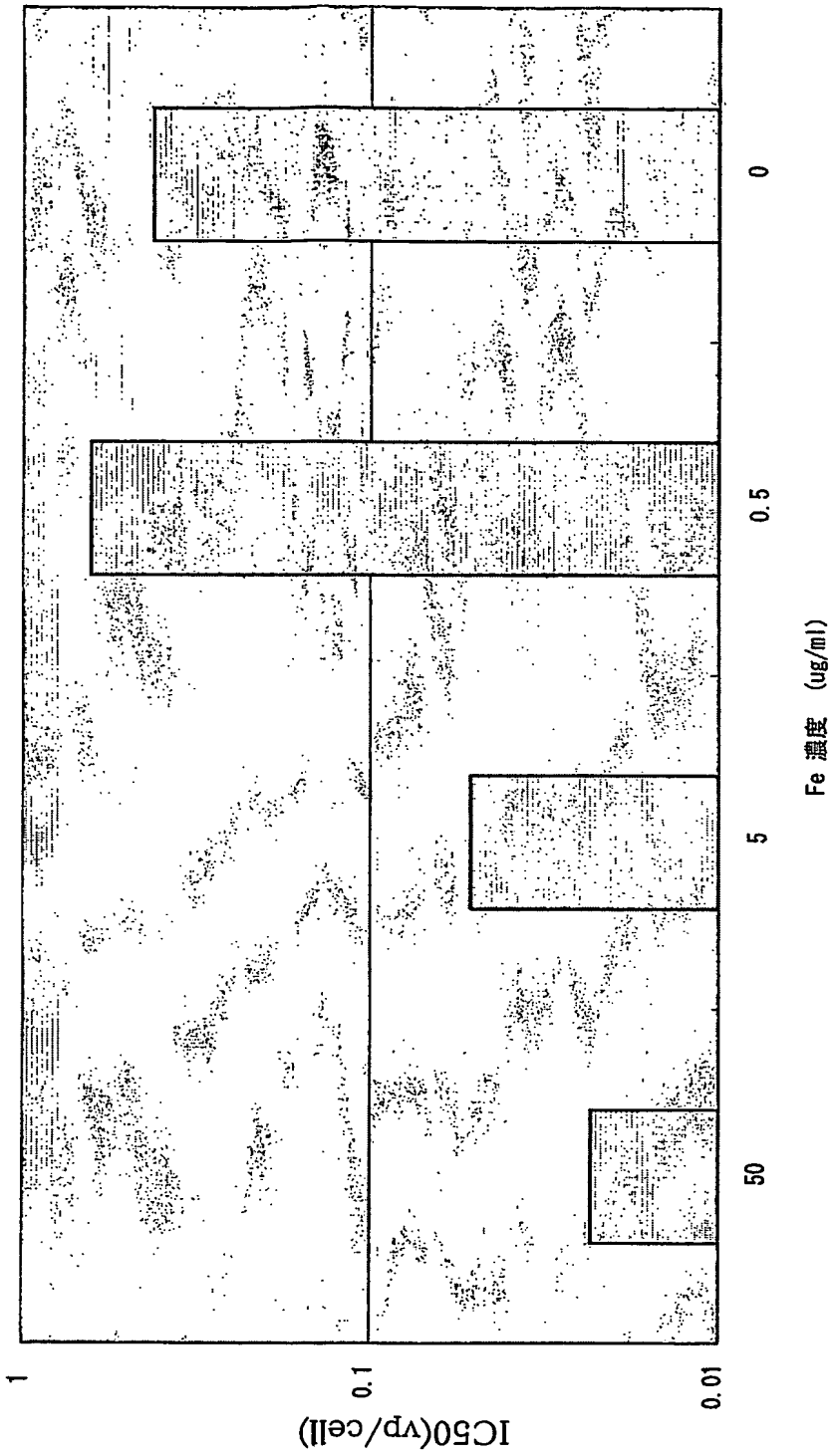
【図１３】


(a)
AdMK600
AdMK2300
AdWild
IC50 (vp/cell)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
Normal Brain
U87MG
U251MG
LN319
U373MG
(b)
AdMK600
AdMK600-ΔE3
IC50 (vp/cell)
1
0.1
0.01
0.001
U251MG
LN319
U373MG
(c)
U87MG
腫瘍体積(mm3)
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
1
10
20
30
投与後日数
U373MG
腫瘍体積(mm3)
1800
1400
1000
600
200
0
1
10
20
30
投与後日数

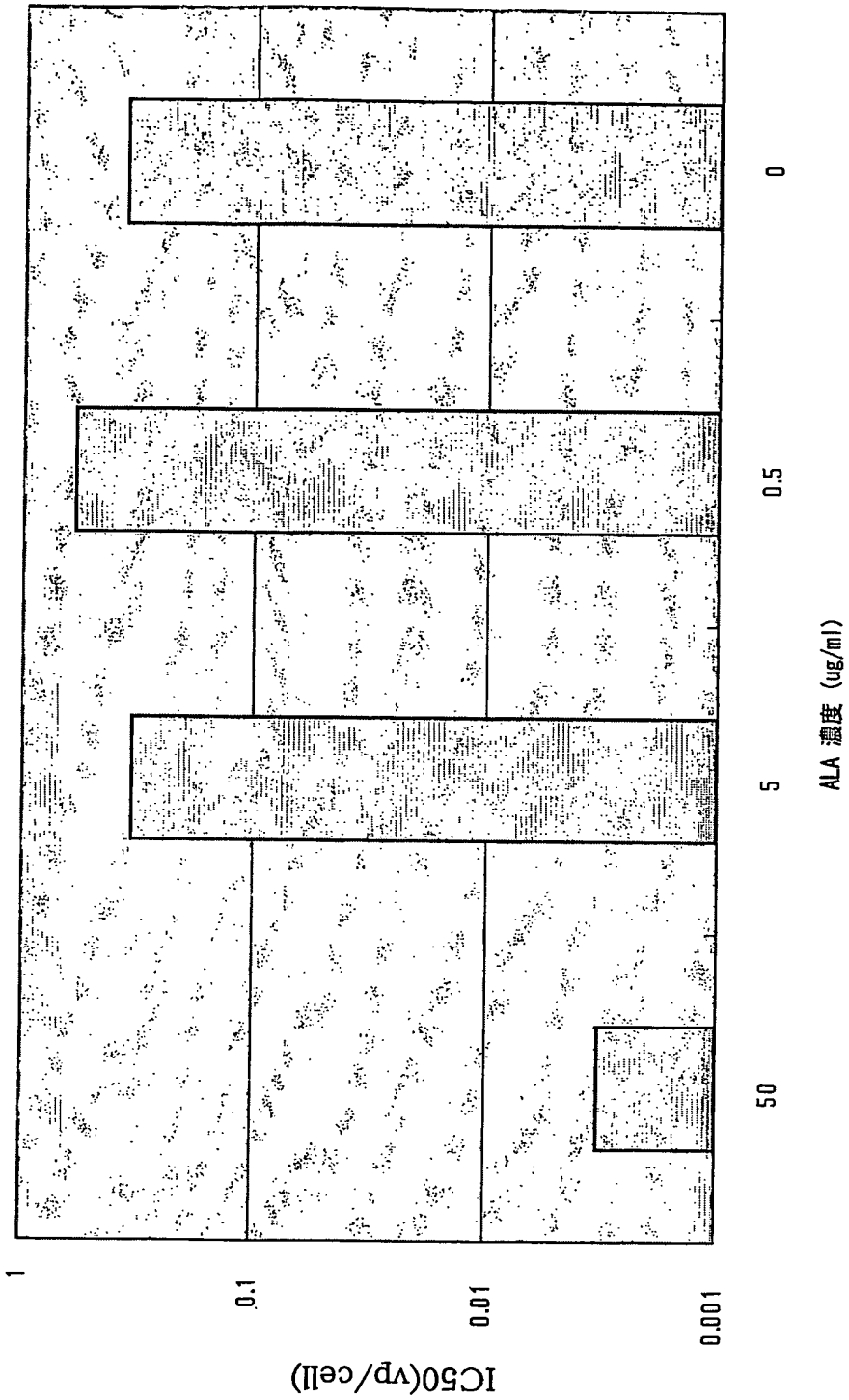
【図１４】


腫瘍体積（mm3）
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
control
Ad-MK600
293
A549

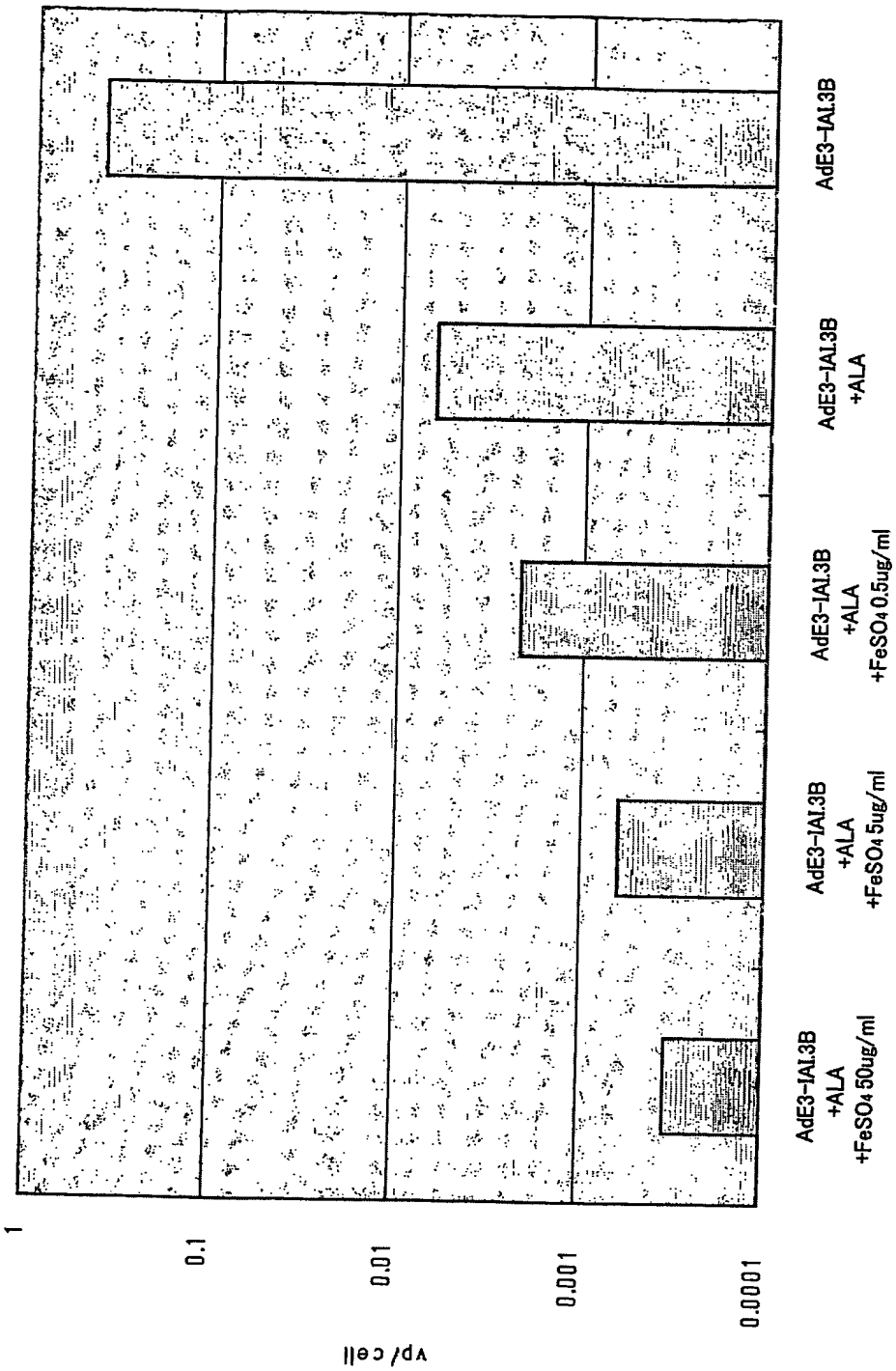
【図１５】



【図１６】



【図１７】


AdE3-IAI.3B
AdE3-IAI.3B +ALA
AdE3-IAI.3B +ALA +FeSO4 0.5ug/ml
AdE3-IAI.3B +ALA +FeSO4 5ug/ml
AdE3-IAI.3B +ALA +FeSO4 50ug/ml
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
vp/ cell

【書類名】要約書
【要約】
【課題】オンコリティックウイルスを用いた癌遺伝子治療において、強力な抗腫瘍効果が得られる新たなキャリアー細胞を見出すこと。また、劇的な抗腫瘍効果が得られる新たな癌遺伝子治療法を確立し、同治療法に用いる新たな癌遺伝子治療薬を提供すること。
【解決手段】本発明の第一の癌遺伝子治療薬は、オンコリティックウイルスを感染させ、同ウイルスを腫瘍細胞に作用させるためのキャリアー細胞を含み、当該キャリアー細胞には、強力な抗腫瘍効果が認められたＡ５４９細胞、２９３細胞、ＳＷ６２６細胞、ＨＴ―ＩＩＩ細胞のいずれかが使用される。また、本発明の第二の癌遺伝子治療薬は、生体のＣＴＬ反応を誘導するために投与される免疫処置用ウイルスと、オンコリティックウイルスを感染させ、同ウイルスを生体の腫瘍細胞に作用させるためのキャリアー細胞とを組み合わせたものである。
【選択図】なし

特願２００３－３５４９８３

出願人履歴情報

識別番号　［８０００００５７］

１．変更年月日　２０００年１２月　６日
［変更理由］　名称変更
住所　兵庫県神戸市中央区港島南町１丁目５－２
氏名　財団法人新産業創造研究機構